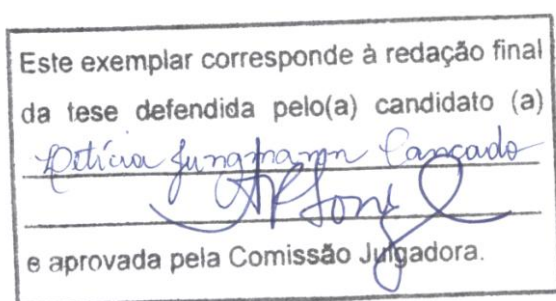


**Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia**



**Caracterização da diversidade
genética molecular em germoplasma
de *Brachiaria* spp.**

Tese apresentada à banca examinadora
do Instituto de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do
título de Doutor em Genética e Biologia
Molecular, área de Genética Vegetal e
Melhoramento



Letícia Jungmann Cançado
(Aluna)

Dra. Anete Pereira de Souza
(Orientadora)

Dra. Cacilda Borges do Valle
(co-Orientadora)

**Campinas – São Paulo – Brasil
2009**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C16c

Cançado, Letícia Jungmann

Caracterização da diversidade genética molecular em
germoplasma de *Brachiaria* spp. / Letícia Jungmann
Cançado. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores: Anete Pereira de Souza, Cacilda Borges
do Valle.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Capim-brachiaria. 2. Poliplóide. 3. Variabilidade
genética. 4. Marcadores moleculares. 5. Banco
germoplasma. I. Souza, Anete Pereira de. II. Valle,
Cacilda Borges do. III. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Título em inglês: Molecular genetic diversity characterization in a germplasm collection of *Brachiaria* spp.

Palavras-chave em inglês: Brachiaria; Polyploidy; Genetic variability; Molecular markers; Germplasm collection.

Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento.

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Anete Pereira de Souza, José Francisco Montenegro Valls, Marcelo Mattos Cavallari, Mateus Mondin, Rosângela Maria Simeão Resende.

Data da defesa: 15/05/2009.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

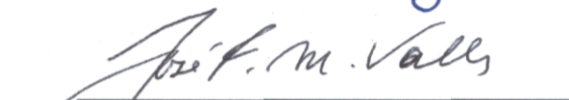
Campinas, 15 de maio de 2009

BANCA EXAMINADORA

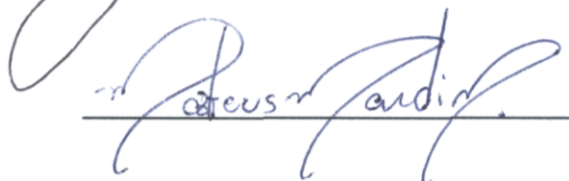
Dra. Anete Pereira de Souza



Dr. José Francisco Montenegro Valls



Dr. Mateus Mondin



Dr. Marcelo Mattos Cavallari



Dra. Rosângela Maria Simeão Resende



Dr. Antônio Augusto Franco Garcia

Dr. José Baldin Pinheiro

Dr. Marcos Antônio Machado



Cidade Universitária "Zeferino Vaz",
09 de abril de 2009.

CIBio: 02/2009

Projeto CIBio: 14/2003

Identificação:

03/2003 – **Doutorado:** Letícia Jungmann Cançado, Bióloga, CPG-GBM UNICAMP

Projeto: Desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo microssatélites para forrageiras de importância econômica no Brasil visando aplicações no melhoramento.

Agência: EMBRAPA – CNP Gado de Corte – Campo Grande

Parecer:

Projeto aprovado pela CIBio/CBMEG em 13/02/2003 sob número 14/2003 (em andamento)

Coordenador: Profa. Dra. Anete Pereira de Souza

Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato

Presidente da CIBio/CBMEG - UNICAMP

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Campinas,
por tudo que aqui me foi oferecido, desde o conhecimento técnico a todos os demais aspectos da minha vida acadêmica. São incontáveis os aprendizados que vivenciei nestes quase 10 anos de estudos nesta instituição

À Embrapa Gado de Corte,
nas pessoas do Dr. Rafael Geraldo de Oliveira Alves, do Dr. Cleber Oliveira Soares, do Sr. Tenisson Waldow de Souza e da Sra. Lucia Gatto, pela oportunidade de realizar este trabalho de tese na Universidade Estadual de Campinas e pelo conhecimento que me foi passado nos últimos 6 anos de vida profissional

À minha querida orientadora, Dra. Anete Pereira de Souza,
por todos os ensinamentos, todas as oportunidades, todos os apoios e todos os carinhos. Não haverá um só dia em minha vida profissional que não me lembrarei de você como um exemplo a ser seguido

À minha caríssima co-orientadora, Dra. Cacilda Borges do Valle,
por ter me mostrado este feliz caminho por entre as Brachiarias. Pelos sábios ensinamentos e pelos conselhos sempre dados e sempre válidos. Pelas valiosíssimas informações, sempre disponibilizadas, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp)
pelos recursos que propiciaram a realização deste trabalho

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
igualmente, pela disponibilização de recursos para viabilizar este trabalho

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect)
pela bolsa concedida durante a realização deste trabalho

À Associação para o Fomento à Pesquisa de Melhoramento de Forrageiras Tropicais (Unipasto)
pelo continuado apoio aos projetos com Forrageiras da Embrapa

À minha mãe, Maria Inês,
pela minha existência e pela sua. Você construiu em mim a base de tudo o que sou

À minha avó, Lita,
por ser a minha segunda mãe. A minha segunda base

Ao meu parceiro de vida, Vitor,
presente que eu ganhei da vida. Amigo, irmão, cúmplice, amor...
Pelo apoio incondicional para a realização deste trabalho

A toda a minha família,
pelo carinho com que sempre me apoiaram

Às amigas, colegas e parceiras, jovens geneticistas, Bianca e Patrícia
sem vocês este trabalho não teria sido tão prazeroso.
Pelas horas e horas de dedicação e pela preciosa amizade que surgiu nesta jornada

Às grandes companheiras Adna e Tatiana,
pelos dias e dias passados lado a lado na bancada e pelas ótimas
experiências compartilhadas ao longo destes anos. Esta amizade foi um presente

Ao Juverlande Lugli, o Jú...
o que seria de nossas teses e de nós mesmos sem você, hein, Jú?

Aos companheiros de laboratório, todos...
por terem feito parte de tantos bons momentos no laboratório e pelas trocas, infinitas

À amiga e colega Maria Imaculada Zucchi,
pela grande ajuda em todos os momentos necessários, pelas aulas concedidas,
as metodologias discutidas. Tudo, sempre, com muito carinho

À amiga e colega Rosângela M. S. Resende,
por compartilhar comigo todos os sabores deste trabalho,
sempre disponível a contribuir com o que fosse necessário

Ao amigo e colega Marcelo Mattos Cavallari,
pelo enorme apoio na realização das análises,
pela disponibilidade e boa vontade sempre demonstradas

A toda a equipe de Melhoramento de Forrageiras Tropicais
da Embrapa Gado de Corte,
cujo trabalho tem gerado frutos de valor inestimável para o Brasil e resultou na produção de
informações usadas nesta Tese de Doutorado

Às colegas Lucimara Chiari e Gisele O. C. Leguizamon,
pelas horas passadas sob Sol para coletar o material de Brachiaria no campo

À Universidade Estadual de Maringá,
nas pessoas da Dra. Maria Suely Pagliarini e da Dra. Kellen R. Boldrini,
pela gentileza em ceder informações citogenéticas

Às colegas da Secretaria do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética
da Unicamp: Tânia, Sandra e Andreza,
pelo profissionalismo e pelo carinho ao longo destes anos

Índice Geral

	PÁGINA
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
APRESENTAÇÃO	1
INTRODUÇÃO GERAL	4
Posicionamento taxonômico do gênero <i>Brachiaria</i>	4
Importância econômica de <i>Brachiaria</i>	6
Coleções de germoplasma <i>ex situ</i>	7
Biologia básica em <i>Brachiaria</i>	9
Descrição das espécies envolvidas neste estudo	12
<i>Brachiaria brizantha</i>	12
<i>Brachiaria decumbens</i>	14
<i>Brachiaria dictyoneura</i>	16
<i>Brachiaria humidicola</i>	17
<i>Brachiaria ruziziensis</i>	18
Marcadores moleculares	19
Caracterização morfológica e molecular do germoplasma de <i>Brachiaria</i> da Embrapa Gado de Corte	21
JUSTIFICATIVA	23
OBJETIVOS	24
CAPÍTULO 1	
Isolation and characterization of microsatellite markers for <i>Brachiaria brizantha</i> (Hochst. ex A. Rich.) Stapf	25
CAPÍTULO 2	
Use of microsatellites developed for <i>Brachiaria</i> <i>brizantha</i> (Hochst. ex A. Rich.) Stapf for revealing inter- and intraspecific genetic diversity in <i>Brachiaria</i> spp.	30
Introduction	31
Materials and Methods	32
Results	37
Discussion	42
References	46

CAPÍTULO 3	
Development of microsatellite markers for	
<i>Brachiaria humidicola</i> (Rendle) Schweick.	49
 CAPÍTULO 4	
A survey of the Brazilian germplasm collection of the	
tropical pasture <i>Brachiaria humidicola</i> (Rendle) Schweick. [Koroniviagrass]	
using microsatellite markers, cytogenetics, morphological traits and	
geographical origin.....	56
Introduction	57
Materials and Methods.....	58
Results	61
Discussion	67
References	70
 DISCUSSÃO GERAL	74
 CONCLUSÕES GERAIS	78
 REFERÊNCIAS GERAIS	79

RESUMO

Brachiaria é um gênero de gramíneas composto por cerca de 100 espécies. Nas últimas décadas, algumas destas espécies vêm sendo amplamente usadas como forrageiras nas regiões tropicais. Uma importante coleção de germoplasma, que preserva 443 acessos e amostra 14 espécies diferentes, foi introduzida no Brasil na década de 1980 e está estabelecida na Embrapa Gado de Corte, Campo Grande/MS. Esta coleção vem sendo usada no Programa de Melhoramento Genético de Forrageiras Tropicais da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. São cinco as espécies de maior valor para este programa de melhoramento: *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis*. Este trabalho visou ao desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo microssatélites para *B. brizantha* e *B. humidicola* e a caracterização da diversidade genética existente em acessos e cultivares destas cinco espécies. Foi desenvolvido um total de 28 microssatélites polimórficos para *B. brizantha* e 27 para *B. humidicola*. Vinte microssatélites desenvolvidos para *B. brizantha* foram usados na caracterização da diversidade genética intra-específica em 160 acessos e cinco cultivares desta espécie. Dentre estes 20 locos, sete foram usados para caracterizar a variabilidade interespecífica entre estes 165 genótipos de *B. brizantha* e 13 acessos de *B. decumbens*, sete de *B. dictyoneura*, 42 de *B. humidicola* e 16 de *B. ruziziensis*. Os 27 microssatélites desenvolvidos para *B. humidicola* foram usados na caracterização da diversidade genética existente nos 58 acessos desta espécie, conservados nesta coleção, além de duas cultivares. A diversidade interespecífica acessada através de similaridades genéticas mostrou que os marcadores utilizados foram capazes de distinguir as cinco espécies estudadas, sendo que *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis* revelaram-se mais similares entre si e mais dissimilares em relação a *B. dictyoneura* e *B. humidicola*. Apesar disso, uma análise Bayesiana revelou que *B. brizantha* e *B. decumbens* compartilham *pools* alélicos entre si, não compartilhados pelas outras espécies. Do mesmo modo, *B. dictyoneura* e *B. ruziziensis* compartilham um *pool* gênico entre si, enquanto que *B. humidicola* apresenta um *pool* gênico distinto. Estes resultados combinados estão discutidos. A análise de diversidade intraespecífica em *B. brizantha* mostrou que os genótipos avaliados foram posicionados em três grupos principais de diversidade, sendo que esta diversidade não está fortemente estruturada. A análise intraespecífica em *B. humidicola* mostrou uma clara distinção do único acesso sexual desta coleção em relação aos demais, todos apomíticos, e revelou que a diversidade genética nesta coleção está mais bem estruturada que a encontrada em *B. brizantha*.

ABSTRACT

Brachiaria is a genus that comprises about 100 species. In the last decades, some of its species have been widely used as forages in the Tropics. A germplasm collection with 14 species represented by 443 accessions was introduced to Brazil in the decade of 1980 and is maintained at Embrapa Beef Cattle, Campo Grande, central Brazil. This collection has been used in the Tropical Forages Breeding Program of the Brazilian Agricultural Research Corporation. The most valuable species, considering agronomical aspects, are: *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura*, *B. humidicola* and *B. ruziziensis*. The main goal of this work was the development of microsatellite markers for *B. brizantha* and *B. humidicola* and the characterization of the genetic diversity found within these species in both inter- and intraspecific approaches. A total of 28 polymorphic microsatellites is described for *B. brizantha*, while for *B. humidicola* we present 27 polymorphic loci. Twenty microsatellites of *B. brizantha* were used for assessing the genetic variability in 160 accessions and five cultivars of this species. Out of these twenty loci, seven were used to evaluate the 165 genotypes of *B. brizantha* and 13 accessions of *B. decumbens*, 7 of *B. dictyoneura*, 42 of *B. humidicola* and 16 of *B. ruziziensis*. Twenty seven loci reported for *B. humidicola* were used in the intraspecific characterization of the genetic diversity of the whole collection of this species (58 accessions) and two cultivars. The interspecific genetic diversity revealed through similarities showed that the markers used were able to distinguish the five species studied. *B. brizantha*, *B. decumbens* and *B. ruziziensis* were the most similar, while *B. humidicola* and *B. dictyoneura* were closer to each other. Besides, a Bayesian analysis showed that *B. brizantha* and *B. decumbens* share exclusive allelic pools not present in the other species. Likewise, *B. dictyoneura* e *B. ruziziensis* share another allelic pool, while *B. humidicola* did not share genic pools with any other species. The intraspecific genetic diversity survey in *B. brizantha* revealed that genotypes were positioned within three major groups, but the genetic variability does not seem to be very structured. The intraspecific survey in *B. humidicola* showed a clear distinction between the one sexual accession of this species and all the other apomictic accessions, and unveiled that the genetic diversity within this species is more strongly structured than in *B. brizantha*.

APRESENTAÇÃO

Os recursos genéticos vegetais possuem alto valor econômico, científico, ecológico e social para a humanidade. Neste sentido, eles representam os recursos naturais mais valiosos, uma vez que fornecem a diversidade genética necessária para promover a sustentabilidade através da manutenção de um ecossistema adequadamente diverso, e para produtores e melhoristas obterem novas cultivares, tanto através do aumento da produção, quanto da melhora qualitativa, da adaptação a ambientes e da resistência a pragas e patógenos. Deste modo, a conservação e o uso adequado de recursos genéticos desempenham um papel primordial para o equilíbrio ambiental e para a agropecuária - conseqüentemente, para a alimentação humana. As atividades de conservação e uso de germoplasma envolvem a coleta, a manutenção, a caracterização e a valoração da diversidade genética existente. Especialmente a caracterização é um aspecto crucial em todo o processo, uma vez que ela determina a identidade dos acessos preservados em uma coleção, auxiliando na definição das estratégias de uso e conservação dos recursos.

Dentro de uma espécie, os indivíduos diferem geneticamente entre si, mesmo quando se apresentam morfologicamente similares. Esta diversidade genética é a chave da sobrevivência da espécie. O polimorfismo encontrado na molécula do DNA é um dos fatores que determinam a diversidade fenotípica e, indiretamente, a forma como os indivíduos interagem com o ambiente. Quanto maior a variação existente, maior será a chance de existirem variantes alélicas que possam conferir vantagens adaptativas aos desafios ambientais. Assim, a diversidade genética das plantas cultivadas é um dos principais componentes que asseguram o sucesso na produção de alimentos. Diversas das principais plantas cultivadas são poliplóides ou têm origem poliplóide, incluindo cana, trigo, arroz, algodão, banana, café e batata. A questão que salta à mente é: por que os poliplóides são tão bem sucedidos?

A poliploidia desempenha um papel importante na evolução das angiospermas (Stebbins 1971). Estima-se que pelo menos 50% das espécies pertencentes a este grupo são poliplóides, podendo chegar a mais de 70% (revisado por Wendel 2000). A proeminência da poliploidia nestas espécies implica que ela deve conferir alguma significância adaptativa (Osborn et al. 2003). Poliplóides frequentemente exibem novos fenótipos que não são encontrados em seus progenitores diplóides ou que superam as espécies contribuintes (Osborn et al. 2003, citando revisões feitas por Ramsey & Schemske 2002; Levin 1983; Ehrendorfer 1980). Um enorme esforço científico tem sido feito para elucidar a formação, o estabelecimento, a organização do genoma e a evolução molecular de poliplóides (Landergrott et al. 2006, citando Bennett 2004; Soltis et al. 2004). Segundo Leitch & Leitch (2008), em angiospermas, o sucesso de poliplóides recém formados pode ser atribuído, em parte, à sua alta plasticidade na estrutura genômica, manifestada pela tolerância a mudanças no número cromossômico (aneuploidia e poliploidia), ao tamanho do genoma, à mobilidade de elementos de (retro)transposição, às inserções, às

deleções e à re-estruturação epigenômica. Ainda segundo estes autores, a capacidade de suportar alterações em larga escala está associada a uma re-estruturação do transcriptoma, do metaboloma e do proteoma, e pode resultar em modificações fenotípicas e ecológicas. Apesar disso, a maioria dos poliplóides recém formados pode falhar no seu estabelecimento devido a anormalidades meióticas e/ou à escassez de cruzamentos compatíveis. Com isso, o sucesso dos poliplóides é favorecido pela ocorrência em nichos ambientais diferenciais, pela ocorrência de autogamia ou de reprodução assexuada, pela alta fecundidade e por uma história de vida perene (Rieseberg & Willis 2007, citando Baack 2005, Rodrigues 1996 e Levin 1975; Soltis & Soltis 2000). Assim, as adaptações resultantes da poliploidia podem gerar indivíduos capazes de explorar novos nichos ou de se sobressair sobre seus ancestrais (Leitch & Leitch 2008; Osborn et al. 2003). Todo este processo tem sido uma força motriz importante originando a divergência nas angiospermas e, também, da sua diversidade (Leitch & Leitch 2008).

Brachiaria é um gênero cujo sucesso adaptativo é inquestionável. Além de ocorrer naturalmente em quase todo hemisfério sul, suas espécies mostram-se particularmente adaptadas às condições severas das savanas africanas. Semelhante adaptabilidade é constatada nas Américas: além da evidente adaptação de espécies de ocorrência natural, materiais com origem africana colonizaram, em poucas décadas, extensas áreas com condições edafo-climáticas favoráveis e desfavoráveis ao cultivo vegetal. Somada à ocorrência de poliploidia no gênero, a propagação vegetativa resultante da apomixia confere uma vantagem ainda maior para suas espécies na colonização de ambientes diversos.

Numerosos estudos já foram realizados na tentativa de elucidar os mecanismos biológicos responsáveis pelo sucesso adaptativo de *Brachiaria*. Entretanto, um longo caminho parece se apresentar à frente dos pesquisadores, até que um entendimento geral seja alcançado. Apesar de os impactos poderem ser percebidos nos vastos campos ocupados por este material, pouco se conhece sobre as bases genéticas que determinam sua complexidade genômica e seu sistema reprodutivo. Do mesmo modo, a variabilidade genética encontrada no gênero ainda não foi amplamente estudada.

Neste contexto, este trabalho se apresenta como uma abordagem inicial para a caracterização genética molecular, em nível de DNA, de um dos maiores bancos de germoplasma de *Brachiaria* preservados atualmente. Para este fim, foram desenvolvidos marcadores moleculares do tipo microssatélites, específicos para duas espécies do gênero. Além disso, marcadores desenvolvidos para uma destas duas espécies puderam ser empregados na caracterização do germoplasma das cinco espécies de *Brachiaria* de maior valor agrônomo para o Brasil, que correspondem a aproximadamente 65% dos acessos mantidos no banco de germoplasma da Embrapa. Apesar de não estarem aqui apresentadas, as etapas iniciais para o desenvolvimento de microssatélites para as outras três espécies de

interesse para o melhoramento de *Brachiaria* foram realizadas durante o desenvolvimento deste trabalho de tese.

Os resultados obtidos estão apresentados neste manuscrito no formato de artigos, num total de quatro, dos quais um já foi publicado (capítulo 1).

Espera-se que este trabalho some-se a todos os esforços já realizados e auxilie na compreensão da base genética de um material tão valioso. Espera-se ainda que os resultados aqui mostrados, uma vez divulgados, possam contribuir de imediato para os programas de melhoramento de *Brachiaria* hoje em curso. Finalmente, deseja-se que o amadurecimento deste embrião resulte em avanços significativos para toda a cadeia produtiva alicerçada em *Brachiaria*.

INTRODUÇÃO GERAL

POSICIONAMENTO TAXONÔMICO DO GÊNERO *BRACHIARIA*

Brachiaria (Trin.) Griseb. consiste de um grande e diverso gênero composto por aproximadamente 100 espécies que ocorrem nas regiões tropical e subtropical, dos hemisférios ocidental e oriental (Renvoize et al. 1996). Este taxon pertence à família Poaceae, subfamília Panicoideae, tribo Paniceae, subtribo Melinidinae¹.

Segundo Clayton & Renvoize (1986), este gênero é composto por gramíneas anuais ou perenes, fortemente caracterizadas por seus caracteres reprodutivos². *Brachiaria* foi inicialmente descrita como uma subdivisão dentro do gênero *Panicum* por Trinius (1834). Essa sessão foi criada para englobar espécies caracterizadas pela presença de inflorescências com ramificações primárias racemosas (com espiguetas agrupadas, na forma de um racemo), uma vez que as inflorescências típicas de *Panicum* apresentavam espiguetas espalhadas, formando panículas. Cerca de duas décadas depois, após realizar uma nova análise destas mesmas características, Grisebach (1853) promoveu esta subdivisão à categoria de gênero. Stapf (1920) realocou diversas espécies de *Panicum* no gênero *Brachiaria* promovido por Grisebach, com base também nas ramificações primárias racemosas. Diversas revisões taxonômicas foram realizadas desde então, com os objetivos tanto de estabelecer as inter-relações do gênero *Brachiaria* com outros gêneros da tribo Paniceae, quanto de delimitar o gênero em si, através da definição das espécies que o compõem.

Dentro desta tribo, os limites taxonômicos entre *Brachiaria*, *Eriochloa*, *Panicum* e *Urochloa* têm se mostrado inconclusivos. Gonzalez & Morton (2005) descrevem um valioso histórico das controvérsias envolvendo a relação entre estes gêneros e citam diversos autores que re-circunscreveram espécies de *Brachiaria* em *Urochloa*: Veldkamp (2004, 1996a); Zuloaga & Morrone (2003); Wunderlin & Hansen (2001); López-Ferrari & Espejo Serna (2000); Nelson & Fernández (1998); Davidse (1993); Morrone & Zuloaga (1993, 1992, 1991); Webster (1988, 1987) e Nguyen (1966). Ainda segundo Gonzalez & Morton (2005), Sharp & Simon (2002), no entanto, mantém o nome *Brachiaria* para todas as espécies que ocorrem na Austrália

¹ Dados supragenéricos obtidos em Missouri Botanical Garden/TROPICOS/Catalogue of New World Grasses/Nomenclatural database (<http://mobot.mobot.org/W3T/Search/classicvast.html>), acessado em 01 de abril de 2009).

² Inflorescências formadas por racemos dispostos ao longo de uma ráquis central, filiforme ou em forma de fita. As espiguetas são únicas ou pareadas, sésseis ou pediceladas, adaxiais e volumosas. Apesar de a gluma ter o comprimento quase igual ao da espiguetas, geralmente seu comprimento é menor. O lema superior varia de obtuso a agudo, podendo ser, ocasionalmente, mucronado.

e que foram previamente transferidas para *Urochloa* por Webster (1987), até que um estudo cladístico envolvendo toda a tribo seja realizado. Alguns autores não concordam em transferir as espécies anuais de *Brachiaria* que apresentam antécio liso para *Urochloa* (Zuloaga & Morrone 2003; Veldkamp 1996b; Webster 1987). De acordo com Valls³ (comunicação pessoal), o gênero *Urochloa* caracteriza-se por apresentar rugosidades no antécio fértil, enquanto que o gênero *Brachiaria* apresenta antécio fértil liso. Por esta razão, espécies inicialmente descritas como *Brachiaria* e que, entretanto, apresentavam antécio rugoso, foram transferidas para *Urochloa*. Entretanto, estudos envolvendo a micro morfologia da epiderme antecial, realizados por Thompson & Estes (1986), revelaram um alto nível de gradação e inter-relação entre *Brachiaria*, *Eriochloa* e *Urochloa*.

Com o crescimento da importância econômica alcançada pelo gênero *Brachiaria* a partir da década de 1980, uma parceria entre o Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) resultou num evento denominado "International Workshop on the Biology, Agronomy and Improvement of *Brachiaria*", realizado em Cali, Colômbia, em 1994. A partir das discussões iniciadas neste encontro, foi publicado um livro abordando a biologia, a agronomia e o melhoramento de *Brachiaria* (Miles et al. 1996), no qual Renvoize et al. (1996) fizeram uma revisão morfológica e taxonômica do gênero utilizando 97 espécies, incluindo as de importância econômica.

Este histórico mostra como a nomenclatura destes taxa tem sido altamente disputada desde a sua descrição e evidencia que as diversas tentativas de delimitação entre *Brachiaria*, *Eriochloa*, *Panicum* e *Urochloa* realizadas ao longo dos anos, em sua grande maioria, estão baseadas em atributos morfológicos da inflorescência. O único estudo para estes gêneros que envolve filogenia molecular (Gonzalez & Morton 2005) sugere *Brachiaria-Urochloa* como um complexo.

Assim sendo, embora a mudança de nomenclatura botânica de algumas espécies, originalmente descritas como pertencentes a *Brachiaria*, possa vir a ser reconhecida pela comunidade científica geral, é necessário considerar que uma alteração definitiva deve ainda contemplar aspectos legais sérios envolvendo as espécies em questão. No território brasileiro, e nos países com os quais o Brasil mantém relações comerciais envolvendo *Brachiaria*, é vigente todo um arcabouço legal e regulamentar de fitossanidade e de proteção de cultivares, que protocola e normatiza ações de quarentena, de experimentação no campo e de comercialização de sementes.

Portanto, assumindo-se que uma mudança nomenclatural deve contar com uma abrangente compreensão da sua real necessidade, decidiu-se, neste trabalho, adotar a nomenclatura utilizada por Renvoize et al. (1996), que aloca, dentro de *Brachiaria*, as espécies

³ José Francisco Montenegro Valls, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

mencionadas a seguir. No texto que se segue os binômios *B. arrecta*, *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura*, *B. dura*, *B. humidicola*, *B. jubata*, *B. mutica*, *B. nigropedata*, *B. plantaginea*, *B. ruziziensis* e *B. xantholeuca* fazem referência, respectivamente, às espécies *Brachiaria arrecta* (Hack. ex Durand & Schinz) Stent, *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf, *Brachiaria decumbens* Stapf, *Brachiaria dictyoneura* (Fig. & De Not.) Stapf, *Brachiaria dura* Stapf, *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick., *Brachiaria jubata* (Fig. & De Not.) Stapf, *Brachiaria mutica* (Forssk.) Stapf, *Brachiaria nigropedata* (Ficalho & Hiern) Stapf, *Brachiaria plantaginea* (Link) Hitchc., *Brachiaria ruziziensis* Germain & Evrard e *Brachiaria xantholeuca* (Hack. ex Schinz) Stapf⁴.

IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DE *BRACHIARIA*

A pecuária bovina brasileira, de corte e de leite, abrange, atualmente, cerca de 170 milhões de cabeças de gado e baseia-se, essencialmente, na utilização de pastagens para a alimentação animal. Estas pastagens cobrem extensas áreas no Brasil, hoje estimadas em cerca de 172 milhões de hectares (IBGE 2006), sendo que 85% dos pastos cultivados são formados por capins do gênero *Brachiaria* (Macedo 2006) e sustentam o maior rebanho comercial do mundo (Torres Jr et al. 2004). Para se ter uma idéia do que isso representa para o Brasil, um dos países de maior fronteira agrícola do mundo, a área ocupada por lavouras, permanentes e temporárias, ocupa algo em torno de 77 milhões de hectares (IBGE 2006).

Uma das grandes vantagens competitivas do sistema agropecuário brasileiro consiste no fato de o pecuarista basear a produção de carne na criação praticada sobre pastos. Esta característica representa competitividade tanto para o mercado interno quanto para a exportação, já que o mercado consumidor exige, cada vez mais, qualidade associada a segurança alimentar. O cenário internacional de aumento na demanda por carne de qualidade e o registro de problemas de sanidade em países tradicionalmente exportadores deste produto possibilitaram ao Brasil sobressair-se como o maior exportador mundial de carne bovina desde o ano de 2003.

Enquanto as gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria* vêm sendo exploradas pelos sistemas agropastoris africanos há milênios, o interesse por suas espécies como forrageiras cultivadas surgiu somente nos anos 1960, em pequena escala, na costa tropical úmida da

⁴ De acordo com Missouri Botanical Garden/TROPICOS/Catalogue of New World Grasses/Nomenclatural database (<http://mobot.mobot.org/W3T/Search/classicvast.html>, acessado em 01 de abril de 2009) botanicamente a seguinte classificação é adotada para algumas espécies: *Urochloa arrecta* (Hack. ex Durand & Schinz) Morrone & Zuloaga, *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich) Webster; *Urochloa decumbens* (Stapf) Webster, *Urochloa dictyoneura* (Fig. & De Not.) Veldkamp, *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga, *Urochloa jubata* (Fig. & De Not.) Sosef, *Urochloa mutica* (Forssk.) Nguyen, *Urochloa ruziziensis* (Germain & Evrard) Morrone & Zuloaga e *Urochloa xantholeuca* (Hack. ex Schinz) Scholz

Austrália. A introdução nas Américas deste gênero com finalidade forrageira é mais recente do que a de outros, como *Panicum* (capim-colonião), *Pennisetum* (capim-elefante), *Melinis* (capim-gordura) ou *Hyparrhenia* (capim-jaraguá), trazidos da África no período colonial (Parsons 1972). Neste período, somente umas poucas espécies africanas, como *B. plantaginea* e, provavelmente, *B. mutica*, foram introduzidos como cama para os escravos em navios negreiros (Sendulsky 1978; Parsons 1972). O grande impacto de *Brachiaria* nos sistemas agropecuários só foi percebido depois da década de 1970. Por uma adaptação excepcional a solos ácidos e de baixa fertilidade natural, pela sua agressividade na competição com espécies invasoras e por resultarem em bom desempenho animal, alguns ecótipos de braquiária, introduzidos entre 1950 e 1975, tiveram, nas quatro décadas seguintes, uma ampla expansão nos cerrados brasileiros e savanas da América tropical. Ao longo deste período, a tecnificação da produção de sementes com visando suprir este grande mercado posicionou o Brasil como o maior produtor e exportador mundial de sementes forrageiras tropicais. Como consequência, cultivares [cv(s).] produzidas para os ecossistemas brasileiros acabaram por impactar sistemas de produção de ruminantes em todo o mundo tropical (Valle et al. 2008).

Até meados da década de 1990, somente cinco acessos pertencentes a quatro espécies africanas (*B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura* e *B. humidicola*) deram origem a 20 cultivares liberadas em países da América tropical, entre eles: Brasil, Colômbia, Costa Rica, Cuba, Equador, México, Panamá, e Venezuela (Keller-Grein et al. 1996). Além disso, pastos formados por *Brachiaria* expandem-se por parte do sudeste asiático. A importância econômica combinada destas espécies advém do fato de sua adoção extensiva ter causado um impacto revolucionário na produtividade de vastas áreas, até então subutilizadas. Atualmente, as braquiárias mais exploradas comercialmente no Brasil pertencem a: *B. brizantha* (exemplos: cvs. MG4, MG5, Marandu, Piatã, Toledo e Xaraés), *B. decumbens* (exemplos: cvs. Ipean, Basilisk), *B. humidicola* (exemplos: cvs. Humidicola comum, Tully), *B. mutica* (capim-Angola ou Bengo) e *B. ruziziensis* (exemplos: cvs. Kennedy e Ruziziensis comum).

Mais de 85% das pastagens brasileiras são formadas pelas cultivares Marandu (*B. brizantha*) e Basilisk (*B. decumbens*) (Valle & Milles 1994), constituindo, assim, extensos monocultivos clonais, cuja vulnerabilidade coloca em risco todo o sistema produtivo.

COLEÇÕES DE GERMOPLASMA EX SITU

A manutenção apropriada de recursos genéticos é essencial para minimizar tanto a deriva quanto a erosão genéticas, assim como a mistura e a contaminação de acessos. Em *Brachiaria* esta questão se torna especialmente delicada, devido à dificuldade de conservação do material na forma de sementes, uma vez que a sua produção e processamento apresentam limitações

(Hopkinson et al. 1996), em especial a perda de viabilidade. Por esta razão, a maioria dos recursos genéticos deste gênero é preservada em coleções mantidas no campo.

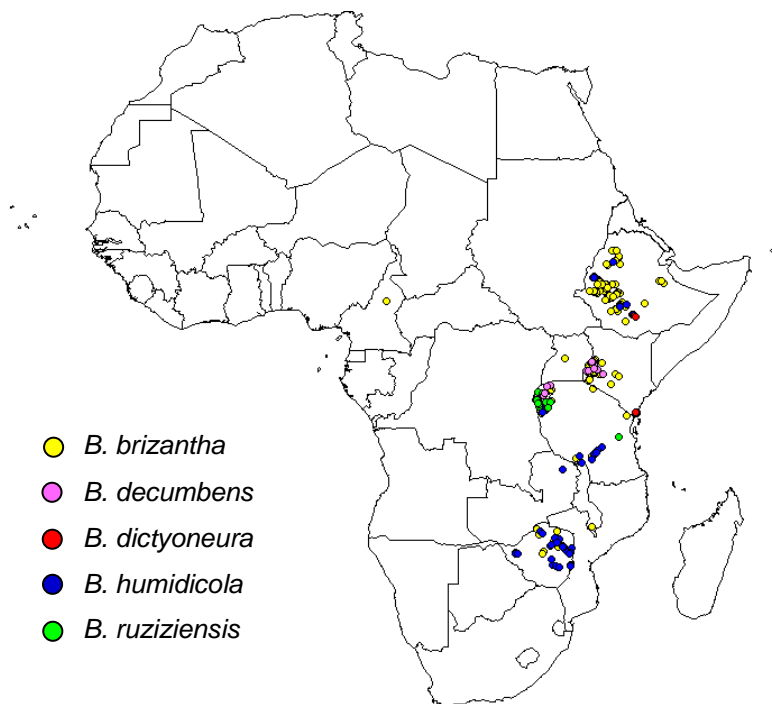
Devido à maioria das espécies de *Brachiaria* se reproduzirem predominantemente por apomixia, problemas relacionados à contaminação de acessos por polinização aberta são quase inexistentes. No entanto, a capacidade de alastramento deste material no campo é tamanha, especialmente em época de chuvas, que somente uma manutenção permanente das parcelas é capaz de evitar a mistura entre elas. Ainda assim, a dispersão de sementes pelo vento dificilmente pode ser impedida e, ocasionalmente, resulta em alguma contaminação. Por outro lado, os acessos sexuais seriam mais bem preservados se conservados *in vitro*. No entanto, nenhum método visando esta finalidade tem sido aplicado nas coleções existentes (Keller-Grein et al. 1996).

Coleções importantes foram estabelecidas nos anos 1970, tanto pelo *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization* (CSIRO, Austrália) (Strickland 1972; Staples 1971) quanto pelo *United States Department of Agriculture* (USDA, Estados Unidos) (USDA 1978, 1974), através de missões não focadas especialmente em *Brachiaria*. Desde este período até o ano de 1984, um projeto da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) resultou na coleção de mais de 200 acessos do gênero (Keller-Grein et al. 1996). Em meados da década de 1980, uma grande expedição de coleta (específica para *Brachiaria*) foi realizada pelo CIAT em colaboração com o *International Livestock Centre for Africa* (ILCA, hoje denominado *International Livestock Research Institute*). Esta expedição contou com o suporte do *International Board of Plant Genetic Resources* (hoje denominado *Plant Genetic Resources Institute*) e de instituições nacionais de pesquisa em agricultura de seis países onde o germoplasma foi coletado (Burundi, Etiópia, Kênia, Ruanda, Tanzânia e Zimbábue) (Milles et al. 2004). Aproximadamente 800 acessos, compreendendo um total de 23 espécies de *Brachiaria* foram coletados.

Em todo o mundo, o gênero *Brachiaria* conta hoje com sete coleções conservadas *ex situ*. Estas coleções estão preservadas no CIAT (687 acessos), ILCA (520 acessos), ATFGRC/CSIRO (*Australian Tropical Forage Genetic Resource Centre*, 177 acessos obtidos com as expedições de coleta realizadas pelo CSIRO), USDA (90 acessos) GBK (*Genebank of Kenya*, 51 acessos), RGI/ARC (*Roodeplat Grassland Institute/African Research Council*, 39 acessos) e Embrapa (443 acessos). Muitos destes acessos, na verdade, são duplicatas dos mesmos ecótipos. Estima-se que juntas, estas coleções conservam um total de 978 acessos distintos, pertencentes a 33 espécies descritas (Keller-Grein et al. 1996).

A coleção importada pela Embrapa está lotada na Embrapa Gado de Corte (EGC), em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. Este banco ativo de germoplasma (BAG) é mantido

Figura I.1. Distribuição geográfica no continente africano dos pontos de coleta de acessos das cinco espécies de *Brachiaria* de maior valor agrônômico para o Programa de Melhoramento de Forrageiras Tropicais da Embrapa Gado de Corte.



no campo e inclui 14 espécies diferentes. Cinco dessas espécies apresentam maior valor agrônômico: *B. brizantha* (226 acessos), *B. decumbens* (52 acessos), *B. dictyoneura* (oito acessos), *B. humidicola* (58 acessos) e *B. ruziziensis* (25 acessos). As demais espécies possuem menor interesse imediato para o melhoramento, mas a exploração da sua variabilidade pode ser de grande utilidade.

A figura I.1 mostra o mapa do continente africano e os respectivos pontos de coleta de acessos das cinco espécies principais, cujas coordenadas geográficas estão disponíveis em <http://isa.ciat.cgiar.org/urg/main.do?language=en>, Base de Dados de Forrageiras do CIAT (acessado em 01 de abril de 2009).

BIOLOGIA BÁSICA EM *BRACHIARIA*

O comportamento cromossômico, os níveis de ploidia e o modo de reprodução em *Brachiaria* são aspectos extremamente importantes para a manipulação das suas espécies em programas de melhoramento, uma vez que a realização de cruzamentos só é viável utilizando-se biótipos sexuais citogeneticamente compatíveis com biótipos apomíticos.

A necessidade de se realizar estudos básicos de citogenética e biologia reprodutiva neste gênero surgiu na década de 1970, quando as primeiras tentativas de obtenção de descendentes férteis em cruzamento entre *B. decumbens* e *B. ruziziensis* fracassaram (Ferguson 1974; Ferguson & Crowder 1974). Apesar de estas serem duas espécies afins, a

barreira de ploidia existente entre elas (*B. decumbens*, apomítico, tetraplóide X *B. ruziziensis*, sexual, diplóide) impediu a obtenção de híbridos interespecíficos. A partir de então, tornou-se evidente que, tanto a presença de apomixia, quanto a variação no nível de ploidia representaria uma enorme barreira a ser transposta para realização de melhoramento genético em braquiárias. Duas formas de sobrepor estes limites foram propostas por estes autores: 1) criar um tetraplóide compatível para cruzamentos a partir da duplicação cromossômica do genótipo sexual de *B. ruziziensis* ou 2) produzir hexaplóides férteis a partir da duplicação do número de cromossomos dos híbridos interespecíficos triplóides inférteis. Uma década depois Ndikumana (1985) obteve sucesso na produção de híbridos através do cruzamento de um ecótipo sexual, tetraplóide induzido, de *B. ruziziensis* (Gobbe et al. 1981; Swenne et al. 1981) com um tetraplóide apomítico natural de *B. decumbens*.

Segundo Valle et al. (2008), estudos exploratórios do germoplasma introduzido no Brasil incluem a determinação do modo de reprodução, dos níveis de ploidia e do comportamento cromossômico em divisões meióticas.

Dos três tipos de apomixia definidos por Nogler (1984), somente a aposporia do tipo *Panicum* foi observada em *Brachiaria* (Valle & Savidan 1996). Neste tipo de apomixia, um saco embrionário derivado da meiose pode estar presente juntamente com sacos embrionários apospóricos no mesmo óvulo ou em diferentes óvulos da mesma planta. O desenvolvimento precoce dos sacos apospóricos (Dusi & Williamse 1999; Lutts et al. 1994) resulta no predomínio da reprodução apomítica, mesmo quando uma alta porcentagem de óvulos apresenta um saco embrionário derivado da meiose (Savidan 2000). Ainda assim, a apomixia neste gênero é facultativa, isto é, algumas flores exibem ocasionalmente sacos meióticos passíveis de serem fecundados. A apomixia evidenciada neste gênero é caracterizada também pela ocorrência de pseudogamia, processo em que a polinização é necessária para que o núcleo polar da célula central seja fertilizado pelo núcleo espermático, resultando no desenvolvimento do endosperma.

O modo de reprodução foi determinado para a ampla maioria dos acessos conservados no BAG da EGC. A análise de sacos embrionários, através de microscopia com contraste de interferência, revelou que acessos classificados como sexuais sempre apresentaram sacos meióticos ou estéreis, mas nunca sacos apomíticos. Acessos apomíticos, no entanto, apresentaram sacos apospóricos, simples ou múltiplos, e porcentagens variáveis de sacos meióticos (Valle et al. 2008). Estes resultados revelaram fontes de sexualidade para *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis*, dentre outras espécies de menor valor agrônômico imediato.

Nas primeiras análises realizadas para determinar o nível de ploidia do material conservado no BAG da EGC (Penteado et al. 2000), detectou-se, através de citometria de fluxo, uma grande variação intra e interespecífica no conteúdo de DNA deste gênero, evidenciando a

grande complexidade citogenética neste taxon. Entre os diferentes níveis de ploidia, são encontrados predominantemente tetraplóides (Valle & Savidan 1996), sendo que a primeira descrição de pentaplóides naturais foi feita em *B. brizantha* (Letteriello et al. 1999; Penteado et al. 1996).

Posteriormente, diversos estudos citogenéticos envolvendo contagem cromossômica e comportamento meiótico foram realizados envolvendo acessos naturais de *B. brizantha* (Felismino et al. 2008a; Vieira et al. 2005; Risso-Pascotto et al. 2003a; Mendes-Bonato et al. 2002a; Mendes-Bonato et al. 2002b), *B. decumbens* (Gallo et al. 2007; Junqueira et al. 2003; Risso-Pascotto et al. 2003b; Mendes-Bonato et al. 2002c), *B. dictyoneura* (Risso-Pascotto et al. 2006a, 2006b), *B. dura* (Gallo et al. 2007), *B. humidicola* (Adamowski et al. 2007; Gallo et al. 2007; Boldrini et al. 2006a, 2006b), *B. jubata* (Mendes-Bonato et al. 2006a, 2003; Risso-Pascotto et al. 2005a), *B. nigropedata* (Utsunomiya et al. 2005) e *B. ruziziensis* (Pagliarini et al. 2008; Risso-Pascotto et al. 2003c). Os tetraplóides artificiais de *B. ruziziensis* (Gobbe et al. 1981; Swenne et al. 1981) obtidos a partir da duplicação por colchicina de acessos sexuais diplóides também foram analisados (Pagliarini et al. 2008; Risso-Pascotto et al. 2005b).

Um dos problemas relacionados à poliploidia é a ocorrência de cromossomos pareados na meiose na forma de multivalentes. Estas, entre outras irregularidades na segregação cromossômica observadas na diacinese, têm como consequência a segregação cromossômica anormal, resultando na formação de gametas não balanceados. Uma das consequências mais comuns das anormalidades meióticas é a migração precoce ou retardatária dos cromossomos para os pólos durante a metáfase, ocasionando a formação de micronúcleos que permanecem nas tétrades mesmo após a dissolução da parede de calose e a liberação do micrósporo. Outras anormalidades, como a aderência dos cromossomos ou assincronia na divisão, seguida de citocinese, podem resultar em produtos anômalos, como políades no lugar de tétrades e micrósporos anucleados. Fusões nucleares dão origem a sincícios e falhas na citocinese podem originar díades, tríades ou, ainda, núcleos de restituição dando origem a gametas $2n$ (não reduzidos) no final do ciclo meiótico. Todas estas anormalidades foram observadas em *Brachiaria* (Valle et al. 2008).

O comportamento meiótico em híbridos (obtidos por cruzamentos interespecíficos utilizando-se os biótipos tetraplóides artificiais de *B. ruziziensis* como genitores femininos e acessos tetraplóides de *B. brizantha* e *B. decumbens* como genitores masculinos) também foi avaliado e mostrou altas frequências de anormalidades meióticas estando, a maioria delas, relacionadas à segregação irregular de cromossomos, típica de poliplóides (Adamowski et al. 2008; Felismino et al. 2008a, 2008b; Fuzinato et al. 2007a, 2007b, 2008; Mendes-Bonato et al. 2006b, 2006c, 2007; Risso-Pascotto et al. 2005c, 2004a, 2004b; Mendes-Bonato et al. 2004).

Evidências citológicas de hibridização natural em acessos pentaplóides de *B. brizantha* foram encontradas por Mendes et al. (2006) e indicaram que genótipos sexuais diplóides de *B. ruziziensis* provavelmente atuaram como parentais no processo de hibridização interespecífica natural que deve ter ocorrido com genótipos apomíticos tetraplóides de *B. brizantha*. Risso-Pascotto et al. (2006c) encontraram indicações de aloploidização durante a formação de um acesso apomítico hexaplóide de *B. brizantha*.

Todos estes resultados de citogenética, em sua maioria obtidos pelo grupo da Dra. Maria Suely Pagliarini (Universidade Estadual de Maringá), têm contribuído para re-contar a história evolutiva dentro do gênero, assim como têm resultado em avanços significativos na determinação de possíveis parentais para realização de cruzamentos, possibilitando a identificação de problemas de divisão celular na meiose que resultam em implicações na viabilidade do pólen e que comprometem produção de sementes nos híbridos (Valle et al. 2008).

DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES ENVOLVIDAS NESTE ESTUDO

A imagem normalmente associada ao gênero *Brachiaria* é baseada na morfologia das espécies mais comuns, como *B. brizantha* e *B. arrecta*, que apresentam espiguetas relativamente largas e oblongas ou elípticas de cerca de 3-6 mm de comprimento, dispostas em uma fileira regular ao longo de um dos lados de uma ráquis em formato de fita (Renvoize et al. 1996). Todavia, várias espécies não seguem este padrão. Um estudo morfológico realizado por Renvoize et al. (1996) revelou uma diversidade marcante em um total de 97 espécies que ocorrem naturalmente nos continentes africano, americano, asiático e australiano. Esta avaliação resultou na formação de 9 grupos que, frequentemente, se sobrepõem.

No presente estudo, serão abordadas cinco espécies de *Brachiaria*: *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis*. A seguir, uma descrição geral dos aspectos conhecidos para estas espécies é apresentada. A figura 1.2 mostra atributos vegetativos e reprodutivos destas cinco espécies.

Brachiaria brizantha

Encontrada em toda a África tropical (Keller-Grein et al. 1996), dentre as espécies de importância econômica é a que apresenta distribuição mais cosmopolita neste continente. É também a de maior utilização como forrageira (Valle et al. 2008). Tem sido cultivada experimentalmente com moderado sucesso no leste e oeste da África, Madagascar, Sri-Lanka, Austrália, Fiji, Suriname. Sua propagação é realizada por sementes. Nos locais de origem, apresenta variabilidade considerável, podendo ser selecionados tipos distintos (Seiffert 1984). É também a espécie mais



Figura I.2. Aspectos reprodutivos e vegetativos de *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis*. No canto superior, à esquerda, é mostrada uma ilustração da planta de *Brachiaria brizantha* (extraída de Miles et al. 2004). Ao centro, à esquerda, é mostrada uma foto com as inflorescências de *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis*. No canto inferior esquerdo, são mostradas fotos de *B. brizantha* e, à direita, fotos de *B. decumbens*, *B. dictyoneura*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis*. Fotos adaptadas de Valle & Pagliarini (2009).

bem representada no BAG da EGC, razão pela qual constitui a maior fonte para seleção de genótipos com finalidade forrageira.

A cultivar Marandu desta espécie está adaptada a diversas condições de clima e solo, tolerando muito bem solos de média fertilidade. Entretanto, não tolera alagamento por períodos superiores a 30 dias. Apresenta boa persistência a pastoreio, alta competitividade com espécies invasoras, tolerância a seca e resistência à cigarrinha das pastagens (Peters et al. 2003).

Apresenta plantas herbáceas perenes, cespitosas, robustas, com 1,5-2,5 m de altura. Seus rizomas são curtos e os caules eretos ou levemente decumbentes (60-150 cm de altura, ocasionalmente, 200 cm). Produzem raízes nos entrenós. As folhas são lanceoladas, com pouca ou nenhuma pubescência, podem apresentar ou não pilosidades. A inflorescência é racemosa, consistindo de 2 a 16 racemos (4-20 cm de comprimento) e as espiguetas são elípticas (4-6 mm de comprimento), com ou sem pilosidades na extremidade. Normalmente, estão dispostas em uma única fileira. A ráquis apresenta cor arroxeada, em forma de crescente. As glumas e o lema inferior apresentam textura cartilaginosa (<http://www.tropicalforages.info/>, acessado em 20 de junho de 2009; Peters et al. 2003; Assis 2001).

Diversas cultivares desta espécie já foram lançadas no Brasil a partir de seleção direta no germoplasma africano introduzido na década de 1980, com destaque para MG4, MG5, Marandu, Piatã, Toledo e Xaraés. A cultivar Marandu apresenta resistência à cigarrinha das pastagens, é tolerante à seca, ao frio, apresenta média exigência com relação à fertilidade dos solos, tolerando inclusive solos ácidos. Tem bom valor forrageiro e alta produção de massa verde (Vilela 2005). Por estas razões, responde pela grande maioria dos pastos brasileiros.

Esta espécie é predominantemente poliplóide e apomítica, tendo, entretanto, fontes de sexualidade já descritas (Valle et al. 2008; Keller-Grein et al. 1996). O número cromossômico básico da espécie é $x = 9$ e já foram reportados acessos pentaplóides (Letteriello et al. 1999; Penteado et al. 1996), diplóides, tetraplóides e hexaplóides (Valle et al. 2002). Dentre os acessos preservados no BAG da EGC, somente um acesso sexual, diplóide foi encontrado até o momento. Pinheiro et al. (2000) testaram protocolos para duplicação cromossômica deste acesso, com a aplicação de colchicina em explantes cultivados *in vitro*. Cinco plantas duplicadas foram obtidas e mantiveram a sexualidade, com comportamento meiótico estável e prevalência de bivalentes na meiose (Araújo et al. 2005).

Brachiaria decumbens

Também é originária da África, apresentando uma distribuição mais restrita à região central e ao leste deste continente (Keller-Grein et al. 1996). Ocorre em campos e margens de matas caducifólias (Valle et al. 2008). Suas plantas formam relvado de folhas junto ao solo, sendo

bastante procuradas pelo gado. Pode suportar uma pressão de pastejo considerável - em Uganda, cargas animais pesadas converteram pastagens originais em pastagens dominadas por *B. decumbens* (Bodgan 1977).

Apresenta adaptação a um amplo espectro de ambientes, crescendo bem em solos ácidos e pobres. Tolerância a secas prolongadas, apresenta fácil multiplicação por sementes e compete bem com invasoras. Entretanto, não se estabelece em regiões mal drenadas e apresenta alta susceptibilidade à cigarrinha das pastagens (Peters et al. 2003), razão pela qual o seu uso foi relativamente reduzido, nas últimas décadas, na América tropical. Ainda assim, os pastos formados por *B. decumbens* ocupam o segundo lugar em extensão territorial no Brasil.

Brachiaria decumbens foi introduzida oficialmente no Brasil em 1952, pelo Instituto de Pesquisas Agropecuárias do Norte (Ipean), em Belém, com o nome *B. brizantha*. A partir de 1965 ocorreram novas introduções dessa *B. decumbens* (que ficou conhecida como cv. Ipean) juntamente com as primeiras introduções de *B. brizantha* e *B. ruziziensis*. Outro ecótipo de *B. decumbens*, originário da Uganda e levado para a Austrália em 1930, onde foi registrado como cv. Basilisk, foi introduzido no Brasil pelo Instituto de Pesquisas Internacionais (IRI) em Matão, São Paulo, no início da década de 1960. Entre 1968 e 1972, com incentivos governamentais e intensa importação de sementes dessa cultivar da Austrália, formaram-se extensos monocultivos nos cerrados brasileiros (Valle et al 2008).

Suas plantas são herbáceas, perenes, de porte semi-ereto a prostrado, rizomatosas e estoloníferas. Apresentam de 0,6-1 m de altura. Produzem raízes nos entrenós. As folhas são lanceoladas e moderadamente pilosas (cerca de 7-20 mm de largura e 5-25 cm de comprimento). As inflorescências são racemosas, com 2-7 racemos (1-5 cm de comprimento) que nascem em um eixo de cerca de 10 cm. As espiguetas são elípticas (4-5 mm de comprimento), dispostas em duas fileiras, em ráquis achatadas (<http://www.tropicalforages.info/>, acessado em 20 de junho de 2009; Peters et al. 2003; Assis 2001).

Brachiaria decumbens apresenta características que se sobrepõem às de *B. brizantha* e espécimes destes dois taxon muitas vezes são difíceis de distinguir. A maior diferença entre estas duas espécies consiste no hábito de crescimento, sendo *B. brizantha* mais ereta, enquanto *B. decumbens* é mais decumbente e forma uma cobertura mais densa. Morfologicamente é possível distingui-las também pelo formato da ráquis e pelo fato de *B. brizantha* apresentar espiguetas dispostas em uma única fileira, enquanto que *B. decumbens* apresenta espiguetas dispostas em duas fileiras. Além do arranjo diferenciado, as espiguetas apresentam também texturas diferentes nestas duas espécies.

Assim como *B. brizantha*, *B. decumbens* é uma espécie onde predominam a poliploidia e o modo de reprodução apomítico. Estudos citológicos realizados por Gallo et al. 2007; Riso-Pascotto et al. 2003b; Junqueira et al. 2003 e Mendes-Bonatto et al. 2003a revelaram que o

número cromossômico básico apresentado por esta espécie é $x = 9$. Todos os acessos avaliados nestes trabalhos revelaram-se tetraplóides ($2n = 4x = 36$). Pela análise do modo reprodutivo realizada em *Brachiaria*, 20 acessos sexuais diplóides foram encontrados dentre os 52 acessos preservados no BAG da EGC (Valle et al. 2008). Dez destes acessos foram cultivados *in vitro* e submetidos à duplicação somática cromossômica, sendo que pelo menos um acesso foi duplicado com sucesso (Simioni & Valle 2006). A viabilidade deste material para utilização no melhoramento genético, pelo cruzamento com acessos apomíticos tetraplóides naturais está sendo avaliada (Valle⁵, comunicação pessoal).

Brachiaria dictyoneura

Esta espécie está distribuída de norte a sul do leste africano (Keller-Grein et al. 1996). É uma espécie próxima de *B. humidicola*, com a qual já foi confundida por alguns autores. Segundo Maass (1996), Skerman & Riveros (1990) consideram *B. dictyoneura* um sinônimo de *B. humidicola*. A confusão entre estes nomes surgiu quando um espécime estolonífero de *B. humidicola* da Rodésia (atualmente Zimbábue) foi distribuído sob a identificação de *B. dictyoneura*, com a finalidade de desenvolvimento de pastagens (Bodgan 1977). *B. humidicola* refere-se a plantas estoloníferas, enquanto a espécie *B. dictyoneura* apresenta plantas cespitosas. Ademais, estas as duas se diferenciam pela inflorescência, mais ramificada em *B. dictyoneura* (3-6 ramificações) do que em *B. humidicola* (3-4 ou mais ramificações) (Valle, comunicação pessoal).

Trata-se de uma espécie perene, semi-ereta, cespitosa e rizomatosa, que mede cerca de 40-90 cm de altura. Apresenta rizomas subterrâneos de dois tipos: um em forma de nódulos pequenos e compactos, e outro longo e fino, semelhante a estolões. Na junção da lâmina foliar com a bainha na parte exterior, há uma nítida saliência em forma de cordão ondulado, por onde as folhas velhas se destacam. As folhas dos estolões são curtas e lanceoladas de (40-60 mm de comprimento e 8 mm de largura). As folhas dos ramos floríferos são mais estreitas e mais longas do que as dos estolões (80-150 mm de comprimento e 8-10 mm de largura). As dos ramos vegetativos, são lineares, com 300-400 mm de comprimento e 8 mm de largura, glabras, de cor verde pálida e fortemente denticuladas nas margens. Inflorescências com 3-15 racemos (2-0 mm de comprimento). As ráquis, em geral, têm 1 mm de largura. As espiguetas apresentam em média 7 mm de comprimento, bisseriadas ao longo da ráquis. A primeira gluma é do comprimento da espiguetas e apresenta nervuras longitudinais, numerosas e paralelas. O lema é estéril e esparsamente piloso (Peters et al. 2003; Sendulsky 1977).

Risso-Pascotto et al. (2006a, 2006b) realizaram estudos citológicos em cinco acessos de *B. dictyoneura* preservados no BAG da EGC e identificaram um número cromossômico básico

⁵ Cacilda Borges do Valle, Embrapa Gado de Corte

$x = 6$, nunca antes descrito para o gênero *Brachiaria*. Esta mesma análise revelou que os acessos avaliados eram todos tetraplóides ($2n = 4x = 24$). De acordo com Valle (comunicação pessoal), um acesso sexual foi encontrado dentro os oito acessos preservados nesta coleção.

Brachiaria humidicola

Ocorre, naturalmente, no leste e no sudeste da África, geralmente em campos de alagamento sazonal (Keller-Grein et al. 1996). Representa a segunda espécie em abrangência de distribuição no continente africano e está relativamente bem representada no BAG da EGC, com 58 acessos dos 64 acessos da coleção do CIAT (Valle et al. 2008).

É uma espécie de lento estabelecimento, apresentando bom comportamento em solos de textura, fertilidade e acidez variáveis. Suporta solos encharcados e se adapta bem a regiões inclinadas. Por isso é recomendada para o controle de erosões. Apresenta baixa qualidade de forragem e dormência prolongada nas sementes, o que acarreta problemas de germinação (Petters et al. 2003). Foi introduzida na Amazônia com bastante sucesso, o que a tornou conhecida como capim-quicuio da Amazônia. De acordo com Serrão (1977), devido a perdas sérias causadas a pastagens de *Brachiaria decumbens* em 1972-1973 por cigarrinhas, sugeriu-se a propagação de *B. humidicola*, por esta apresentar-se tolerante ao inseto na região amazônica. A partir de 1973, *B. humidicola* começou a difundir-se em larga escala nesta região, havendo tendência para substituir gradualmente a *B. decumbens*. Esta espécie também teve sua área de plantio na região dos cerrados ampliada.

É uma espécie perene, fortemente estolonífera e rizomatosa, que forma uma densa cobertura do solo e pode atingir 1 m de altura. Apresenta colmos vegetativos prostrados ou arqueados na parte inferior, enraizando a partir dos nós inferiores. Os colmos reprodutivos são eretos (20-60 cm de altura). As folhas são lanceoladas (com 5-16 mm de largura e até 30 cm de comprimento; na maioria das vezes fica em torno de 12 cm ou menos), glabras ou esparsamente pilosas. As bainhas foliares carecem de pilosidades. As inflorescências são terminais e racemosas, apresentando de 2-5 racemos pilosos, em forma de espícula, amplamente espaçados em um eixo central. As espiguetas são longas (4,5-5,5 mm de comprimento), pilosas, verdes manchadas de roxo e estão dispostas em duas fileiras ao longo de cada lado de um eixo estreito e angulado (<http://www.tropicalforages.info/>, acessado em 20 de junho de 2009; Peters et al. 2003; Assis 2001).

Assim como *B. dictyoneura*, esta espécie apresenta número cromossômico básico $x = 6$, conforme evidenciado por Gallo et al. (2007); Adamowski et al. (2007); Boldrini et al. (2006a, 2006b). Segundo Pagliarini⁶ (comunicação pessoal), a coleção da EGC apresenta acessos

⁶ Maria Suely Pagliarini, Universidade Estadual de Maringá

hexaplóides, heptaplóides e nonaplóides. De acordo com Valle (comunicação pessoal), um acesso hexaplóide sexual está presente nesta coleção, enquanto todos os demais são considerados apomíticos.

Brachiaria ruziziensis

Também de origem africana, apresenta distribuição natural bem restrita (Burundi, Ruanda e Zaire) (Keller-Grein et al. 1996) e, assim como *B. decumbens*, ocorre em campos e margens de matas caducifólias. Foi cultivada inicialmente no Congo (Zaire), onde, combinada a *Setaria anceps*, forma a base das pastagens cultivadas. No Brasil, foi introduzida primeiramente na região amazônica e, posteriormente, na região Centro-Oeste. Entretanto, foi substituída gradualmente, por não tolerar o ataque de cigarrinhas. Segundo Serrão & Simão Neto (1971) esta espécie emana um odor peculiar, semelhante ao capim gordura (*Melinis minutiflora* Beauv.).

Embora tolere a acidez, exige solos de média fertilidade e bem drenados. Apresenta boa tolerância ao sombreamento. É indicada para solos fortemente ondulados. Produz forragem de boa qualidade nutricional (Assis 2001).

Esta é uma espécie perene, cespitosa, com rizomas curtos que formam uma densa cobertura foliar. Os colmos partem de gemas em perfilhos horizontais e de rizomas curtos, e chegam a medir 1,5 m, quando da época de florescimento. As folhas são macias e pilosas (cerca de 25 cm de comprimento e 15 mm de largura). As inflorescências consistem de racemos (3-9) relativamente longos (4-10 cm), apresentando espiguetas (5 mm de comprimento) pilosas, bisseriadas em um dos lados de uma ráquis larga, achatada e alada (<http://www.tropicalforages.info/>, acessado em 20 de junho de 2009; Assis 2001).

Brachiaria ruziziensis é uma espécie proximamente relacionada à *B. decumbens*, da qual se diferencia morfológicamente pelo formato da ráquis, que apresenta 2-3,5 mm de largura na primeira e 1-1,7 mm de largura na segunda, assim como pela posição da gluma inferior, que está posicionada a 0,5-1 mm de distância do restante da espiguetas em *B. ruziziensis* e bem próxima à gluma superior em *B. decumbens* (<http://www.tropicalforages.info/>, acessado em 20 de junho de 2009).

Esta espécie apresenta número cromossômico básico $x = 9$, conforme evidenciado por Risso-Pascotto et al. (2003c) e Pagliarini et al. (2008). Todos os 25 acessos do BAG da EGC são sexuais (Valle, comunicação pessoal). Sete acessos desta coleção consistem de materiais duplicados artificialmente por colchicina (Gobbe et al. 1981; Swenne et al. 1981). Dos demais, 16 acessos foram citogeneticamente analisados (Pagliarini et al. 2008) e mostraram-se diplóides ($2n = 2x = 18$).

MARCADORES MOLECULARES

O desenvolvimento da técnica de eletroforese de isoenzimas no início da década de 1960 iniciou a era dos marcadores moleculares. A técnica baseia-se na detecção de mutações no código genético, as quais resultam em alterações na sequência de aminoácidos (com consequente alteração da carga elétrica) de algumas proteínas com atividade enzimática. Após realização de eletroforese com as amostras de proteína, o polimorfismo é detectado por meio de visualização do produto enzimático por métodos bioquímicos. Os marcadores isoenzimáticos podem ser obtidos de uma maneira relativamente rápida e barata, e podem ser facilmente desenvolvidos para praticamente todas as espécies de plantas. Após o desenvolvimento desta tecnologia, a utilização de isoenzimas permitiu a detecção de polimorfismo entre plantas que não mostravam diferenças morfológicas, o que possibilitou a realização de uma melhor avaliação da variação genética (Torggler et al. 1995).

Marcadores isoenzimáticos já foram utilizados na detecção de híbridos de *Brachiaria* (Lapointe & Miles 1992; Cruz et al. 1989; Hacker 1988). Também foram usados na caracterização de 416 acessos de *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis* pertencentes à coleção de germoplasma do CIAT (Keller-Grein et al. 1996). Nesta última análise, três sistemas isoenzimáticos geraram 332 padrões distintos dentre os 416 acessos avaliados, permitindo uma discriminação de 80% dos acessos, o que demonstrou a alta variabilidade natural existente nesta coleção de germoplasma.

O poder de detecção de variabilidade diretamente ao nível do DNA só foi alcançado com avanço de técnicas de biologia molecular. O primeiro marcador molecular desenvolvido com esta natureza baseia-se na ação de enzimas de restrição, as quais reconhecem sequências específicas no DNA e clivam a molécula nestes sítios. Os efeitos de mutações pontuais, inserções, deleções e rearranjos nos sítios de clivagem criam polimorfismos que podem ser visualizados pela diferença de tamanho dos fragmentos de DNA obtidos após a digestão enzimática. A detecção é feita por *Southern blotting*. Esta variação encontrada entre indivíduos foi denominada RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms* - Botstein et al. 1980).

Clones de cDNA e genômicos de milho já foram utilizados para a realização de RFLP em *Brachiaria* por Pessino et al. (1997), que identificaram marcadores que co-segregavam com a apomixia em uma população F_1 de *B. ruziziensis* ($2n = 4x = 36$) X *B. brizantha* cv. Marandu ($2n = 4x = 36$). Posteriormente, Pessino et al. (1998) utilizaram estes marcadores na construção de um mapa detalhado da apo-região em *Brachiaria*, utilizando esta mesma população.

A descrição da reação de polimerase em cadeia ou PCR (*Polymerase Chain Reaction* - Mullis & Faloona 1987), permitindo a síntese enzimática de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, provocou uma verdadeira revolução nas técnicas de biologia molecular. Desde então, diversos marcadores moleculares baseados nesta metodologia têm sido

descritos. AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*), RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Welsh & McClelland 1990; Williams et al. 1990) e SCARs (*Sequence Characterized Amplified Regions*), são exemplos das muitas técnicas baseadas em PCR que abriram novas e inúmeras possibilidades de detecção e avaliação do polimorfismo encontrado na molécula de DNA. Dentre estas técnicas, destacam-se os marcadores microssatélites.

Marcadores do tipo AFLP foram usados por Pessino et al. (1998, 1997), juntamente com marcadores RFLP, na identificação de marcadores ligados à apomixia e para mapear a aporegião em *Brachiaria*. Jamnadass et al. 2006 utilizaram marcadores AFLP e RAPD no estudo da diversidade genética genótipos selvagens de *Brachiaria xantholeuca*, sujeitos a pastejo ao longo de um gradiente de precipitação no oeste da Nigéria, com a finalidade de identificar genótipos adaptados que poderiam ser usados na recuperação de áreas degradadas. Ambiel et al. (2008); Chiari et al. (2008, 2007); Chiari et al. (2007) e Bonato et al. (2002) utilizaram marcadores RAPD para acessar a diversidade genética de espécies de *Brachiaria* do BAG da EGC (maiores detalhes destes trabalhos são apresentados na próxima sessão). Chiari⁷ (comunicação pessoal) utilizou marcas RAPD aparentemente associadas à apomixia, selecionadas em *bulks* segregantes de acessos sexuais e apomíticos dos BAG da EGC, para o desenvolvimento de SCARs que possam ser aplicadas ao programa de melhoramento de *Brachiaria* spp..

Microssatélites, ou repetições de sequências simples (SSR, do inglês *simple sequence repeats*), são regiões de DNA que consistem de repetições em *tandem* de pequenos motivos de DNA contendo de 1 a 6 nucleotídeos. Estas repetições estão distribuídas por todo o genoma eucarioto e podem ser analisadas utilizando-se a técnica de PCR. Para tanto, deve-se considerar que as sequências que flanqueiam um loco de microssatélite são conservadas dentro de uma espécie e, muitas vezes, entre espécies diferentes de um gênero. Estas sequências flanqueadoras são utilizadas para o desenho de *primers*, visando amplificar locos de microssatélites. Os marcadores SSR revelam polimorfismos individuais, devido à variação existente, entre espécimens, no número de repetições em *tandem* de um determinado motivo de DNA em cada loco de microssatélites (Tautz & Renz 1984; Varshney et al. 2002).

Os microssatélites são marcadores codominantes que geram dados similares àqueles gerados por isoenzimas, porém com números de alelos e heterozigosidade muito maiores (Ferreira & Grattapaglia 1998; Varshney et al. 2002). Devido ao seu alto grau de polimorfismo, os microssatélites tornaram-se os marcadores ideais para o mapeamento genético, estudos populacionais ou mesmo para seleção assistida. Microssatélites foram empregados com sucesso na demonstração de tipos verdadeiros entre acessos e cultivares de bancos de germoplasma, detectando duplicações, mistura de sementes, deriva, e cruzamentos não controlados (Olufowote et al. 1997). Também foram empregados na determinação do grau de

⁷ Lucimara Chiari, Embrapa Gado de Corte

parentesco entre indivíduos (Yang et al. 1994), no esclarecimento da estrutura genética ou da divisão da variação entre indivíduos, populações e espécies (Dayanandan et al. 1999; White et al. 1999; Collevatti et al. 2001), além de possibilitar a construção de mapas genéticos (Wu & Tanksley 1993; Bell & Ecker 1994; Akkaya et al. 1995; Cregan et al. 1999) em diversas espécies.

Até a finalização deste trabalho, o único trabalho já publicado envolvendo a descrição de marcadores microssatélites específicos para *Brachiaria* é da autoria de Jungmann et al. (2009) e está apresentado no capítulo 1 desta tese.

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DO GERMOPLASMA DE *BRACHIARIA* DA EMBRAPA GADO DE CORTE

Visando facilitar o trabalho de seleção e cruzamentos em uma grande coleção como o germoplasma de *Brachiaria* da EGC, um trabalho de caracterização foi realizado por Assis et al. (2003) usando 24 descritores morfológicos (vegetativos e reprodutivos) em 301 acessos de seis diferentes espécies (*B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura*, *B. humidicola*, *B. jubata* e *B. ruziziensis*). Foram conduzidas duas análises discriminantes, uma por componentes principais e outra de Anderson. A dispersão gráfica dos acessos possibilitou o conhecimento da divergência genética, revelada por marcadores fenotípicos, entre os acessos e as espécies. A análise multivariada permitiu a organização das espécies em três grandes grupos, sendo um deles constituído por *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis*, outro formado por *B. dictyoneura* e *B. humidicola* e um terceiro formado por *B. jubata* isoladamente (Assis et al. 2003).

Enquanto que, dentre os caracteres utilizados na análise, os vegetativos foram os mais importantes na discriminação das seis espécies combinadas, os caracteres reprodutivos foram os responsáveis pela discriminação entre *B. brizantha* e *B. ruziziensis* e os de pilosidade foram os que diferenciaram *B. decumbens* de *B. humidicola*. Em geral, os caracteres de pilosidade foram os menos eficientes em discriminar as seis espécies estudadas. Entretanto, foram os únicos que permitiram distinguir *B. dictyoneura* de *B. humidicola*.

A diversidade genética existente no banco de germoplasma de *Brachiaria* da EGC, acessada ao nível de polimorfismos encontrados no DNA, conta com trabalhos em que foram utilizados marcadores moleculares do tipo RAPD. Bonato et al. (2002) avaliaram a diversidade genética em acessos de *Brachiaria* spp.. Chiari et al. (2008) analisaram 14 genótipos, entre cultivares e acessos, de *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis*. Ambiel et al. (2008) também estimaram a diversidade em cinco acessos (distintos dos utilizados por Chiari et al. 2008) de *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis* e em sete cultivares de *B. brizantha*. Assim como a caracterização morfológica realizada por Assis et al. (2003), este trabalhos

mostraram uma clara separação entre as espécies estudadas, evidenciando que a diversidade revelada por marcadores morfológicos pode ser acessada também por marcadores de DNA. Chiari et al. (2007) estimaram a diversidade genética dos 58 acessos de *B. humidicola* preservados nesta coleção. Este trabalho ressaltou, pelo método de Tocher, a formação de 4 grupos distintos de similaridade, sendo que o método UPGMA (*Unweighted pair-group method, arithmetic average*), baseado em similaridades genéticas resultou em um agrupamento semelhante. Devido à inexistência de marcadores moleculares específicos para *Brachiaria*, nenhuma caracterização molecular utilizando marcadores desta natureza foi descrita até o momento.

Considerando-se a grande variação observada no gênero *Brachiaria* envolvendo níveis de ploidia e comportamento cromossômico, assim como a impossibilidade de exploração da diversidade genética existente neste BAG, dada a ocorrência de apomixia, nenhum deste trabalhos foi aplicado à uma organização sistemática do material preservado como, por exemplo, o estabelecimento de uma coleção nuclear ou de uma coleção de trabalho.

JUSTIFICATIVA

A intensificação da atividade pecuária pressupõe o desenvolvimento de cultivares de forrageiras com melhor desempenho animal e eficiência na utilização dos insumos. Isto resulta na demanda por variedades melhoradas e adaptadas aos diversos ecossistemas pastoris. No Brasil, *Brachiaria* responde pela ampla maioria das pastagens utilizadas para a criação animal. Apesar da grande diversidade genética intra e interespecífica observadas a olho nu neste gênero, duas cultivares provenientes de seleção direta de ecótipos superiores de *B. brizantha* (cv. Marandu) e *B. decumbens* (cv. Basilisk) formam extensos monocultivos em grande parte da área ocupada por pastos. O fato de estas cultivares reproduzirem-se por apomixia, o que resulta em sementes clonais, agrava este cenário, uma vez que nova variabilidade não é gerada através de cruzamentos naturais.

Visando explorar a variabilidade existente no gênero para a geração de novas cultivares, uma coleção de germoplasma de *Brachiaria* foi importada para o Brasil na década de 1980. Com isso, um programa de melhoramento foi estabelecido pela Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias. Entretanto, a complexa organização do genoma deste material, em grande parte atribuída à poliploidia, e as limitações impostas pelo seu sistema reprodutivo dificultam a realização de cruzamentos que resultem em progênie férteis e viáveis. A realização de estudos de biologia básica, visando caracterizar os acessos importados quanto a estes dois aspectos, e as caracterizações morfológica e agrônômica, já conduzidas, em muito têm contribuído para a obtenção de progressos para o melhoramento. Contudo, pouco ainda se conhece sobre a diversidade genética deste material revelada ao nível do DNA.

Considerando-se que marcadores moleculares são ferramentas extremamente eficientes para esta finalidade, alguns estudos já foram realizados com RAPD e se mostraram eficazes numa primeira elucidação da diversidade existente. Apesar da alta informatividade do RAPD, a natureza inespecífica deste marcador resulta na sua baixa reprodutibilidade e, consequentemente, na obtenção de resultados pouco robustos do ponto de vista genético. Neste contexto, o desenvolvimento de marcadores moleculares específicos para as principais espécies exploradas comercialmente revelou-se de extrema necessidade. Marcadores microssatélites se propõem a este fim e ainda apresentam a vantagem de serem altamente informativos e de revelarem informações de locos individuais no genoma. Além disso, uma vez que já estejam desenvolvidos e em andamento, sua aplicação apresenta custos semelhantes aos do RAPD e não necessita de parque instrumental altamente equipado. Por estas razões, estes marcadores mostram-se úteis não só para a realização de estudos de diversidade, como também para a condução de estudos de mapeamento genético e de trabalhos de seleção assistida que certamente surgirão num programa de melhoramento em que a genética molecular dá os seus primeiros passos.

OBJETIVOS

GERAL

Desenvolver de estudos genético-moleculares envolvendo espécies do gênero *Brachiaria*, a fim de caracterizá-las quanto à diversidade inter e intraespecífica, bem como gerar ferramentas moleculares baseadas em marcadores do tipo microssatélites úteis aos programas de melhoramento dessas espécies.

ESPECÍFICOS

- 1) Construir bibliotecas genômicas enriquecidas com sequências repetitivas do tipo microssatélites para *B. brizantha* e *B. humidicola*,
- 2) Isolar locos contendo estas sequências, desenhar e testar *primers* específicos para a amplificação destes locos,
- 3) Caracterizar os locos isolados em *B. brizantha* e *B. humidicola* quanto à sua informatividade, bem como testar sua transferibilidade recíproca e para *B. decumbens*, *B. dictyoneura* e *B. ruziziensis*,
- 4) Utilizar os locos informativos na caracterização intra-específica da diversidade genética existente no banco de germoplasma de *B. brizantha* e *B. humidicola* da Embrapa Gado de Corte e, por fim,
- 5) Utilizar os locos com transferibilidade bem sucedida na caracterização da diversidade genética interespecífica existente nas cinco espécies de maior importância para o Programa de Melhoramento de Forrageiras Tropicais da Embrapa (*B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis*).

CAPÍTULO 1

Isolation and characterization of microsatellite markers for *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf⁸

L Jungmann, ACB Sousa, J Paiva,
PM Francisco, BBZ Vigna, CB do Valle
MI Zucchi and AP de Souza

Keywords: *Brachiaria brizantha*, Microsatellite markers, Genetic diversity, Transferability

Abstract

The first set of nuclear simple sequence repeat (SSR) loci for *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf is described. A microsatellite-enriched library was constructed and 19 loci were characterized. About 13 SSR loci were found to be polymorphic and across-taxa amplification tests showed that six of them can be transferred to four other species of *Brachiaria*. This new SSR resource will be a powerful tool for population genetic studies of *B. brizantha*, for interspecific genetic studies within the genus *Brachiaria*, for mapping and for marker assisted selection in breeding.

⁸ Artigo publicado pela revista Conservation Genetics. Doi: 10.1007/s10592-009-9839-7

Devido à cessão de direitos de cópia à editora "Springer Science+Business Media B.V.", cópias do artigo publicado

não podem ser reproduzidas. O texto da versão aqui apresentada corresponde exatamente ao texto do original e está em acordo com os termos de divulgação estabelecidos entre os autores e a editora.

A publicação no formato original está disponível em www.springerlink.com ou em <http://www.springerlink.com/content/105709/>

Brachiaria brizantha (Hochst. ex A. Rich.) Stapf is a grass native to tropical Africa, which reproduces predominantly by apomixis and presents high variation in ploidy levels (2, 4, 5, 6 and 9X). Taxonomy within this genus is controversial. Trinius (1834) described *Brachiaria* as a subdivision of *Panicum*. Grisebach (1853) elevated Trinius's subdivision to the category of genus. Webster (1987) has transferred *B. brizantha*, as well as several other species traditionally included in *Brachiaria* to the related genus *Urochloa*. Irrelevant to the taxonomic allocation, Renvoize et al. (1996) demonstrated that this group of species has a highly diverse nature and highlighted its enigmatic status in terms of both the component species and relationships with other genera. *Brachiaria brizantha* is closely related to *B. decumbens* and *B. ruziziensis*, and specimens are at times difficult to distinguish.

This first set of microsatellites for *B. brizantha* is useful not only for conservation of naturally occurring specimens in African savannas, but also for understanding genetic relationships between *B. brizantha* and its related species, and for further mapping and marker assisted selection in breeding.

Genomic DNAs were extracted from freeze-dried leaf samples using the CTAB method (Doyle and Doyle 1987). Genomic DNA of one genotype of *B. brizantha* was restricted with *Rsa* I (Invitrogen), enriched in microsatellite fragments using (CT)₈ and (GT)₈ probes and then used to construct a microsatellite-enriched library following the protocol of Billotte et al. (1999). The enriched microsatellite fragments were cloned into pGEM-T (Promega) and ligation products were used to transform Epicurian Coli XL1-Blue competent cells. A total of 96 clones were sequenced in an ABI 377 automated sequencer (PE Applied Biosystems) using BigDye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems). About 19 pairs of primers were designed for SSR-flanking regions using Primer Select 5.01 (DNASTAR Inc.) and assayed in 23 morphologically divergent genotypes of *B. brizantha* from the germplasm collection of Embrapa Beef Cattle. PCR reactions were performed in a MJ Research PTC-100TM thermocycler in a 25 µl final volume of buffer [20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl and 1.5 mM MgCl] containing 50 ng of genomic DNA, 0.8 µM of each primer, 150 µM dNTPs and 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen). The PCR program consisted of a initial denaturing step at 94°C for 1 min followed by 30 cycles of amplification [94°C (1 min), X°C (1 min), 72°C (1 min)] and a final elongation step at 72°C for 7 min, being X°C the appropriate temperature for amplifying each locus (table 1.1). Amplification products have been resolved by electrophoresis in 3% agarose and 6% denaturing polyacrylamide gels stained according to Creste et al. (2001). All SSR primers amplified successfully in *B. brizantha* and 13 were found to be polymorphic (table 1.1). Considering the ploidy of *B. brizantha*, allele frequencies could not be estimated and heterozygosity, as defined by Nei (1973), could not be calculated.

Table 1.1 Description of SSR markers developed for *Brachiaria brizantha*

SSR locus	Repeat motif	T _a (°C)	Predicted product size	Primers sequences (5' - 3')	Characteristics in <i>B. brizantha</i>			
					No. of bands	Size range	PIC	PD
BbUNICAMP001	(AGAT) ₃	60	288	F: AGCGTGCTGATTCCGACCTT R: GAAATGGCTATGCGAAATGTGT	5	279-288	0.47	0.58
BbUNICAMP002	(CT) ₁₉	60	267	F: TCGCTCGTTTCATTCTTTCAT R: CGCACGCTTATACGACAACATT	20	242-282	0.92	0.98
BbUNICAMP003	(TG) ₈	56	304	F: GCTACAGGCTACGTTGAGAAGA R: ACAGGTGAGCAGTATGAGTCCA	8	278-308	0.55	0.63
BbUNICAMP004	(CA) ₅	60	215	F: ACCCCGCTGCATACCCATAAT R: TTTTGGCCCATCACTCTCTTTG	10	201-221	0.76	0.94
BbUNICAMP005	(TG) ₉	60	208	F: CGTTATGCGGCGACACT R: AAGAACTCCATGAAAAACAGA	6	196-208	0.71	0.87
BbUNICAMP006	(AGC) ₅	60	177	F: GGGGCCACTGACCAAAAC R: GCGTAGCTACCCGAATCC	4	171-180	0.51	0.72
BbUNICAMP007	(TCAT) ₃	56	310	F: TGAGGATCGAAAGAGCAAGAGTT R: TCCGCGAGCAGTATCAATGG	3	315-340	0.44	0.31
BbUNICAMP008	(GT) ₅	60	290	F: GCACATGCAAATAAGAACA R: AAAAGGGTAAGCTAAGAATAAG	2	284-290	0.38	0.14
BbUNICAMP009	(GT) ₆	60	223	F: AGGAGAGGGAGGAGAGGAGAAT R: GCGAGTTGTTAATGAAGTGAGGA	7	216-227	0.72	0.91
BbUNICAMP010	(GT) ₇	60	156	F: TCGTTCAGTTGAGTCGTCTTCT R: GCCATTCCGCCATCATAG	6	142-158	0.61	0.80
BbUNICAMP011	(GGCC) ₂ GGCTGTGT	60	266	F: GCTCGGGAATACAGGCTTGAAA R: GAAACGCGTCGGGGTGATT	3	230-266	0.41	0.57
BbUNICAMP012	(GCAT) ₄	60	196	F: CGCGCATTACAGACTACAGA R: TAGAGAAGGCAATTGATTAGATAG	5	184-204	0.45	0.68
BbUNICAMP013	(CACAC) ₃	60	261	F: ATGCAGCGGAAACATCTC R: ACTTCCTCCACTTCCACTCTG	2	251-261	0.35	0.60

Table 1.2 Cross-species amplification of BbUNICAMP microsatellite markers in four *Brachiaria* species

Microsatellite locus*	<i>Brachiaria</i> species†			
	<i>B. decumbens</i>	<i>B. dictyoneura</i>	<i>B. humidicola</i>	<i>B. ruziziensis</i>
BbUNICAMP001	284/288	288	283/284	279/288
BbUNICAMP002	268/272	242/250/258/262	250/254	264/266/270
BbUNICAMP003	296/304	290/292	278/288	296/304
BbUNICAMP004	205/211/215/221	211/215	207/211/213/215	207/215
BbUNICAMP005	204	204	204	204/206
BbUNICAMP006	171	174/177	174/177	174
BbUNICAMP007	315/330	M	330	330
BbUNICAMP008	284/290	M	M	284/290
BbUNICAMP009	218/223/284/290	M	M	220/284/290
BbUNICAMP010	156	M	M	M
BbUNICAMP011	256	266	M	266
BbUNICAMP012	188	M	M	196
BbUNICAMP013	261	M	M	261

* Alleles observed for each locus are displayed in bp. †One representative accession was analyzed for each species. M: misamplification

Alternatively, polymorphism information content (PIC) values were obtained according to Cordeiro et al. (2003), using frequencies of bands instead of alleles. Efficiencies of the loci in genotype identification were estimated using the discriminating power (PD) (Tessier et al. 1999). The highest value for PD was obtained for loci BbUNICAMP002 and BbUNICAMP004 (0.98 and 0.94, respectively), which correspond to the loci with highest PIC values (table 1.1). Cross-species amplification tests were performed on four *Brachiaria* species, on single individuals by using the same amplification conditions used for *B. brizantha*. Several positive amplifications occurred across all tested species (table 1.2). All the data indicate the potential use of this set of microsatellite markers in genetic studies not only in *B. brizantha*, but also within the genus *Brachiaria*.

Acknowledgements

Authors would like to thank Renato Vicentini dos Santos for bioinformatics support for the project. This work was realized with grants from Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa), Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Research Foundation of the State of São Paulo (Fapesp) and Foundation for Science and Technological Development of the State of Mato Grosso do Sul (Fundect).

REFERENCES

- Billotte N, Lagoda PJR, Risterucci AM, Baurens FC (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54:277–288
- Cordeiro GM, Taylor GO, Henry RJ (2003) Characterization of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* sp.), a highly polyploid species. *Plant Science* 155:161–168. doi:10.1016/S0168-9452(00)00208-9
- Creste S, Tulmann Neto A, Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter* 19:299–306. doi:10.1007/BF02772828
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11–15
- Grisebach A (1853) Gramineae. In: Ledebour CF (ed.) *Flora Rossica*, vol 4. Sumptibus Librariae E. Schweizerbart, Stuttgart, pp 324–484
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 70:3321–3323. doi:10.1073/pnas.70.12.3321
- Renvoize SA, Clayton WD, Kabuye CHS (1996) Morphology, taxonomy, and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb.. In: Miles JW, Maass BL, Valle CB do (eds.) *Brachiaria: biology, agronomy and improvement*. Embrapa/CIAT, Cali, pp 1–15
- Tessier C, David J, This P, Boursiquot JM, Charrier A (1999) Optimizations of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *TAG* 98:171–177
- Trinius CB (1834) *Panicearum genera retractavit speciebusque compluribus illustravit*. The copy in the Smithsonian libraries, dated June 1834 in pencil, is paginated from 1 through 267, and the title page indicates neither city nor publisher. It is a preprint of the paper with the same title in the following: 1835, *Memoires de l'Academie Imperiale des Sciences de Saint-Petersbourg*, sixth series (Sciences Naturelles), 1: 89-355.1
- Webster RD (1987) *The Australian Paniceae (Poaceae)*. E. Schweizerbart, Borntraeger and Cramer Science Publishers, Stuttgart

CAPÍTULO 2

Use of microsatellites developed for *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf for revealing inter- and intraspecific genetic diversity in *Brachiaria* spp.

Keywords: *Urochloa*, *Brachiaria*, microsatellite markers, germplasm, genetic diversity

Abstract

Brachiariagrasses belong to the genus *Brachiaria* (Trin.) Griseb. and represent species largely used as pastures. Its economic importance has been proven all over tropical America. A germplasm collection was established in Brazil in the decade of 1980 and has been explored by the Tropical Forages Breeding Program conducted by the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa). This work reports the development of 15 new microsatellite markers for palisadegrass [*Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf] and their use, along with other five previously reported, to estimate the genetic similarity within 165 genotypes of this species. Similarity index values ranged from 0.26 to 0.97. One duplication was found in the germplasm. A grouping analysis by the unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA) revealed three major groups comprehending most individuals. A Bayesian analysis performed with the software STRUCTURE 2.2 also resulted in three clusters, which were compared with a neighbor joining three based on dissimilarities. These approaches combined suggest that genetic variability within this germplasm is not strongly structured. These 165 accessions of *B. brizantha* and 78 accessions of signal grass [*Brachiaria decumbens* Stapf], Koroniviagrass [*Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick.], ruzigrass [*Brachiaria ruziziensis* Germain & Evrard] and *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick. were analyzed with six of the newly described microsatellites and one previously reported, totalizing seven microsatellites. The approaches used to analyze *B. brizantha* were also applied to the five species combined. *B. brizantha*, *B. decumbens* and *B. ruziziensis* showed the highest similarity indexes, while *B. humidicola* revealed itself as the farthest species in relation to all the others. A PCA plot based on similarities revealed the same grouping pattern observed by preceding studies conducted with morphological markers. The comparison of similarity results with clustering pattern revealed by the Bayesian analysis showed that *B. decumbens* and *B. brizantha* present the same genetic background. The same correspondence was observed for *B. dictyoneura* and *B. ruziziensis*.

INTRODUCTION

Brachiaria (Trin.) Griseb. is a genus of grasses originating in Africa. Some of its species play an important role in the economy of many countries, especially in tropical America, due to their use as fodder plants in support to livestock. The commercially exploited species, vernacularly named brachiariagrasses (Miles et al. 2004), are four: *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf [palisadegrass], *Brachiaria decumbens* Stapf [signal grass], *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick. [koroniviagrass], and *Brachiaria ruziziensis* Germain & Evrard [ruzigrass] (Miles et al. 2004). In Brazil, one of the major beef exporter countries, they correspond to 85% of cultivated pastures (Macedo 2006) and support the biggest cattle flock in the world (Torres Jr et al. 2004). Their use is also widespread throughout other South American countries and areas of Southeastern Asia (Valle et al. 2008).

Because of this economical importance, seven germplasm collections were established for *Brachiaria* around the world, especially after the organization of a plant collection expedition, which focused on this genus, by the Tropical Pastures Program of the International Center for Tropical Agriculture (CIAT) in the middle 1980s (Keller-Grein et al. 1996). One of these germplasm collections has been maintained by the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa) and is held at Embrapa Beef Cattle (EBC). This germplasm base has been explored through its Tropical Forages Breeding Program (TFBP) and preserves 443 accessions of 14 species, including the four important species mentioned above. It has been largely evaluated in agronomical and morphological aspects. Several studies covering basic biology have also been conducted, in order to determine the ploidy level, the chromosome behavior during meiosis and reproduction mode within this material. A compilation of all these results is found in Valle et al. (2008). It has been determined that the agronomic important species present a high inter- and intraspecific variation in ploidy levels Valle et al. (2008). Although pseudogamous aposporous apomixis, which occurs in the genus, is facultative, in most accessions it predominates over sexuality. Only one sexual biotype was found in *B. brizantha* and *B. humidicola*; and several in *B. decumbens*. In *B. ruziziensis* all accessions evaluated were apomictic. Despite the fact that sources of sexuality were found, ploidy differences impose barriers for breeding.

Regardless of the extensive evaluations of this collection, the characterization of the genetic diversity at the molecular level is in its infancy. Machado Neto et al. (2002) evaluated the protein profiling of five accessions of *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura*, *B. humidicola*, *B. jubata* *B. nigropedata* and *B. ruziziensis* using uni-dimensional SDS-PAGE⁹. Studies involving RADP markers were also conducted: Chiari et al. (2008) analyzed a total of 14 genotypes (accessions and cultivars) comprehending *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. humidicola* and *B.*

⁹ Polyacrylamide gel electrophoreses using sodium-dodecyl-sulfate

ruziziensis; Ambiel et al. (2008) evaluated five accessions of *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis* and seven cultivars of *B. brizantha* and Chiari et al. (2007), characterized the whole germplasm of *B. humidicola*. This last work is the most comprehensive approach already related.

Simple sequence repeats (SSRs), or microsatellites, consist of 2 to 6 nucleotide sequences (e.g. AC, AGT and ACCT) repeated n times in tandem throughout the genome [(AC)_n, (AGT)_n and (ACCT)_n]. Genetic diversity in germplasm collections has been extensively explored using these markers in major crops such as cotton (Rungis et al. 2005), maize (Laborda et al. 2005), rice (Ren et al. 2003; Xu et al. 2004; Jayamani et al. 2007), soybean (Hua et al. 2005; Yoon et al. 2009), sugarcane (Cordeiro et al. 2003; Pinto et al. 2006; Brown et al. 2007) and wheat (Dobrovolskaya et al. 2005; Peng et al. 2009). This kind of markers has also proven to be useful for several other applications in breeding.

To date, a panel of 13 SSR markers was developed for *B. brizantha* (Jungmann et al. 2009 - chapter 1, this volume). Here we present 15 new polymorphic microsatellites for this species and estimate the utility of this kind of marker for assessing intra- and interspecific genetic diversity in the five agronomically valuable species of *Brachiaria*.

MATERIALS AND METHODS

Plant Materials

A total of 243 individuals of *Brachiaria* maintained in the germplasm collection of EBC were used in this study. For each species the number of genotypes analyzed was: *B. brizantha* – 160 accessions and 5 cultivars (cvs.); *B. decumbens* – 13 accessions; *B. dictyoneura* – 7 accessions; *B. humidicola* – 42 accessions and *B. ruziziensis* – 16 accessions. Pedigree (as recorded in EBC and CIAT), species and reproduction mode of the material is shown in table 2.1. Freeze-dried leaf samples were used for DNA extraction following the cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) method described by Doyle & Doyle (1987).

Development of new microsatellite markers for *Brachiaria brizantha*

Microsatellite makers were developed with the genomic sequences obtained from a library constructed by Jungmann et al. (2009) (chapter 1, this volume). A total of 15 new primer pairs were designed for SSR-flanking regions using Primer Select 5.01 (DNASTAR Inc.). These primers were assayed in 23 morphologically divergent genotypes (Assis 2001) of *B. brizantha* from the germplasm collection of EBC, following the conditions also described in chapter 1.

Table 2.2 displays information about microsatellite loci characterized. To refer to the formativeness of the new microsatellites, the polymorphism information content (PIC) for each locus was calculated in these 23 accessions as described by Cordeiro et al. (2003).

Genotyping *Brachiaria*

Genotyping *B. brizantha* was performed using five microsatellites shown in table 1.1 (chapter 1, this volume) [BbNICAMP003; BbUNICAMP007; BbUNICAMP009 BbUNICAMP012; and BbUNICAMP013] and the 15 loci shown in table 2.2 (this chapter). Genetic diversity in *Brachiaria* spp. was assessed with one locus from table 1.1 [BbUNICAMP003] and six loci indicated in table 2.2.

PCR products were fractionated on poly-acrylamide gels stained according to Creste et al. (2001). Due to the polyploid status of *Brachiaria*, microsatellites were scored as presence/absence of bands

Statistical analyses

Similarity and dissimilarity (arithmetical complement of similarity) matrices, based on the Jaccard's coefficient, the neighbor joining (NJ) trees and the principal coordinates analysis (PCA) were performed in the software DARwin version 5.0.157 (Perrier and Jacquemoud-Collet [Internet]). The unweighted pair-group method-arithmetic average (UPGMA) dendrogram was constructed with the software NTSYSpc version 2.1 (Rohlf 1997).

The software STRUCTURE version 2.2 (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003) was used to cluster individuals according to distinct allele frequencies sets. Firstly, analyses were conducted for *B. brizantha*. A no-admixture model with allele frequencies correlated was assumed. A value of 500,000 was set both for burn-in and Markov Chain Monte Carlo (MCMC) processes, with 15 iterations per K (K=1 to K=15). In both analyses, the standard deviation of the likelihoods over all iterations per each K was used to infer the best K values.

In a second round, an interspecific analysis was conducted for *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura*, *B. humidicola* and *B. ruziziensis* combined. In this case, the no-admixture model with allele frequencies independent was set to run 15 iterations (K=1 to K=20). Sets for burn-in and MCMC were the same as for *B. brizantha* isolated.

Table 2.1. Information of accessions of *Brachiaria* spp. evaluated with SSRs markers

Accession ID		Species	RM	Accession ID		Species	RM
EBC	CIAT			EBC	CIAT		
B002	26552	<i>B. brizantha</i>	APO	B078	16339	<i>B. brizantha</i>	APO
B009	26557	<i>B. brizantha</i>	APO	B079	16340	<i>B. brizantha</i>	APO
B022	26566	<i>B. brizantha</i>	APO	B080	16442	<i>B. brizantha</i>	APO
B027	667	<i>B. brizantha</i>	APO	B081	16443	<i>B. brizantha</i>	APO
B028	6016	<i>B. brizantha</i>	APO	B082	16444	<i>B. brizantha</i>	APO
B030	6294/6297	<i>B. brizantha</i>	APO	B083	16448	<i>B. brizantha</i>	APO
B031	6682	<i>B. brizantha</i>	APO	B085	16455	<i>B. brizantha</i>	APO
B032	6683	<i>B. brizantha</i>	APO	B088	16469	<i>B. brizantha</i>	APO
B033	6687	<i>B. brizantha</i>	APO	B089	16473	<i>B. brizantha</i>	APO
B034	6688	<i>B. brizantha</i>	APO	B090	16476	<i>B. brizantha</i>	APO
B037	6424	<i>B. brizantha</i>	APO	B091	16477	<i>B. brizantha</i>	APO
B038	6684	<i>B. brizantha</i>	APO	B092	16486	<i>B. brizantha</i>	APO
B039	6690	<i>B. brizantha</i>	APO	B093	16487	<i>B. brizantha</i>	APO
B040	6686	<i>B. brizantha</i>	APO	B095	16799	<i>B. brizantha</i>	APO
B044	6413	<i>B. brizantha</i>	APO	B099	16827	<i>B. brizantha</i>	APO
B046	NI	<i>B. brizantha</i>	APO	B102	16107	<i>B. brizantha</i>	APO
B051	16119	<i>B. brizantha</i>	APO	B103	16110	<i>B. brizantha</i>	APO
B053	16142	<i>B. brizantha</i>	APO	B104	16113	<i>B. brizantha</i>	APO
B054	16146	<i>B. brizantha</i>	APO	B105	16114	<i>B. brizantha</i>	SEX
B056	16160	<i>B. brizantha</i>	APO	B106	16116	<i>B. brizantha</i>	APO
B057	16162	<i>B. brizantha</i>	APO	B107	16120	<i>B. brizantha</i>	APO
B058	16164	<i>B. brizantha</i>	APO	B108	16121	<i>B. brizantha</i>	APO
B059	16168	<i>B. brizantha</i>	APO	B109	16122	<i>B. brizantha</i>	APO
B061	16294	<i>B. brizantha</i>	APO	B110	16123	<i>B. brizantha</i>	APO
B062	16297	<i>B. brizantha</i>	APO	B111	16124	<i>B. brizantha</i>	APO
B063	16298	<i>B. brizantha</i>	APO	B114	16128	<i>B. brizantha</i>	APO
B064	16300	<i>B. brizantha</i>	APO	B115	16130	<i>B. brizantha</i>	APO
B065	16301	<i>B. brizantha</i>	APO	B116	16132	<i>B. brizantha</i>	APO
B066	16302	<i>B. brizantha</i>	APO	B117	16133	<i>B. brizantha</i>	APO
B067	16303	<i>B. brizantha</i>	APO	B118	16134	<i>B. brizantha</i>	APO
B068	16304	<i>B. brizantha</i>	APO	B119	16139	<i>B. brizantha</i>	APO
B069	16305	<i>B. brizantha</i>	APO	B120	16144	<i>B. brizantha</i>	APO
B070	16308	<i>B. brizantha</i>	APO	B121	16145	<i>B. brizantha</i>	APO
B071	16312	<i>B. brizantha</i>	APO	B122	16149	<i>B. brizantha</i>	APO
B073	16318	<i>B. brizantha</i>	APO	B123	16154	<i>B. brizantha</i>	APO
B074	16322	<i>B. brizantha</i>	APO	B124	16156	<i>B. brizantha</i>	APO
B075	16324	<i>B. brizantha</i>	APO	B125	16157	<i>B. brizantha</i>	ND
B076	16337	<i>B. brizantha</i>	APO	B126	16158	<i>B. brizantha</i>	APO
B077	16338	<i>B. brizantha</i>	APO	B127	16161	<i>B. brizantha</i>	APO

Table 2.1. cont.

Accession ID		Species	RM	Accession ID		Species	RM
EBC	CIAT			EBC	CIAT		
B128	16163	<i>B. brizantha</i>	APO	B184	26317	<i>B. brizantha</i>	APO
B130	16169	<i>B. brizantha</i>	APO	B185	16118	<i>B. brizantha</i>	APO
B131	16171	<i>B. brizantha</i>	APO	B186	16126	<i>B. brizantha</i>	APO
B132	16288	<i>B. brizantha</i>	APO	B187	16150	<i>B. brizantha</i>	APO
B133	16289	<i>B. brizantha</i>	APO	B188	16325	<i>B. brizantha</i>	APO
B134	16290	<i>B. brizantha</i>	APO	B189	16438	<i>B. brizantha</i>	APO
B135	16292	<i>B. brizantha</i>	APO	B190	16462	<i>B. brizantha</i>	APO
B136	16295	<i>B. brizantha</i>	APO	B191	16463	<i>B. brizantha</i>	APO
B137	16299	<i>B. brizantha</i>	APO	B192	16480	<i>B. brizantha</i>	APO
B139	16307	<i>B. brizantha</i>	APO	B193	16482	<i>B. brizantha</i>	APO
B140	16309	<i>B. brizantha</i>	APO	B194	16797	<i>B. brizantha</i>	APO
B141	16310	<i>B. brizantha</i>	APO	B195	16439	<i>B. brizantha</i>	APO
B142	16311	<i>B. brizantha</i>	APO	B200	26111	<i>B. brizantha</i>	APO
B143	16313	<i>B. brizantha</i>	APO	B201	26366	<i>B. brizantha</i>	APO
B145	16317	<i>B. brizantha</i>	APO	B203	26375	<i>B. brizantha</i>	APO
B146	16319	<i>B. brizantha</i>	APO	B204	26404	<i>B. brizantha</i>	APO
B147	16320	<i>B. brizantha</i>	APO	B205	16117	<i>B. brizantha</i>	APO
B150	16332	<i>B. brizantha</i>	APO	B209	16809	<i>B. brizantha</i>	APO
B151	16333	<i>B. brizantha</i>	APO	B210	16839	<i>B. brizantha</i>	APO
B152	16334	<i>B. brizantha</i>	APO	B212	16131	<i>B. brizantha</i>	APO
B155	16342	<i>B. brizantha</i>	APO	B213	16136	<i>B. brizantha</i>	APO
B158	16447	<i>B. brizantha</i>	APO	B214	16138	<i>B. brizantha</i>	APO
B159	NI	<i>B. brizantha</i>	APO	B218	16151	<i>B. brizantha</i>	APO
B162	16453	<i>B. brizantha</i>	APO	B219	16152	<i>B. brizantha</i>	APO
B163	16457	<i>B. brizantha</i>	APO	B221	16170	<i>B. brizantha</i>	APO
B165	16461	<i>B. brizantha</i>	APO	B222	16296	<i>B. brizantha</i>	APO
B166	16467	<i>B. brizantha</i>	APO	B225	16341	<i>B. brizantha</i>	APO
B167	16470	<i>B. brizantha</i>	APO	B228	16436	<i>B. brizantha</i>	APO
B168	16472	<i>B. brizantha</i>	APO	B229	16450	<i>B. brizantha</i>	APO
B169	16483	<i>B. brizantha</i>	APO	B230	16454	<i>B. brizantha</i>	APO
B170	16485	<i>B. brizantha</i>	APO	B246	16787	<i>B. brizantha</i>	APO
B171	16505	<i>B. brizantha</i>	APO	B247	16793	<i>B. brizantha</i>	APO
B172	16771	<i>B. brizantha</i>	APO	B250	16810	<i>B. brizantha</i>	APO
B174	NI	<i>B. brizantha</i>	ND	B259	26101	<i>B. brizantha</i>	APO
B175	16801	<i>B. brizantha</i>	APO	B261	26105	<i>B. brizantha</i>	APO
B176	16819	<i>B. brizantha</i>	APO	B263	26124	<i>B. brizantha</i>	APO
B177	16833	<i>B. brizantha</i>	APO	B266	26318	<i>B. brizantha</i>	APO
B178	26110	<i>B. brizantha</i>	APO	B268	26321	<i>B. brizantha</i>	APO
B180	26129	<i>B. brizantha</i>	APO	B270	26389	<i>B. brizantha</i>	ND
B182	26314	<i>B. brizantha</i>	APO	B272	26641	<i>B. brizantha</i>	APO

Table 2.1. cont.

Accession ID		Species	RM	Accession ID		Species	RM
EBC	CIAT			EBC	CIAT		
B289	16197	<i>B. brizantha</i>	APO	H014	16889	<i>B. humidicola</i>	APO
B295	26179	<i>B. brizantha</i>	APO	H016	26149	<i>B. humidicola</i>	APO
MG4	NI	<i>B. brizantha</i>	APO	H017	26154	<i>B. humidicola</i>	APO
MG5	NI	<i>B. brizantha</i>	APO	H018	26155	<i>B. humidicola</i>	APO
M	NI	<i>B. brizantha</i>	APO	H019	16350	<i>B. humidicola</i>	APO
P	NI	<i>B. brizantha</i>	APO	H021	16868	<i>B. humidicola</i>	APO
A*	NI	<i>B. brizantha</i>	APO	H022	16874	<i>B. humidicola</i>	APO
D002	16489	<i>B. decumbens</i>	APO	H024	16878	<i>B. humidicola</i>	APO
D003	16490	<i>B. decumbens</i>	APO	H025	16883	<i>B. humidicola</i>	APO
D004	16493	<i>B. decumbens</i>	SEX	H026	16887	<i>B. humidicola</i>	APO
D005	16494	<i>B. decumbens</i>	SEX	H027	16888	<i>B. humidicola</i>	APO
D006	16495	<i>B. decumbens</i>	SEX	H028	16890	<i>B. humidicola</i>	APO
D008	16498	<i>B. decumbens</i>	APO	H029	16892	<i>B. humidicola</i>	APO
D009	16499	<i>B. decumbens</i>	APO	H030	16894	<i>B. humidicola</i>	APO
D010	16500	<i>B. decumbens</i>	APO	H037	26415	<i>B. humidicola</i>	APO
D011	16501	<i>B. decumbens</i>	APO	H038	26416	<i>B. humidicola</i>	APO
D014	16504	<i>B. decumbens</i>	APO	H039	26427	<i>B. humidicola</i>	APO
D059	6370	<i>B. decumbens</i>	APO	H040	26430	<i>B. humidicola</i>	APO
D077	6298	<i>B. decumbens</i>	APO	H042	16866	<i>B. humidicola</i>	APO
D079	6392	<i>B. decumbens</i>	APO	H043	16869	<i>B. humidicola</i>	APO
DT150	NI	<i>B. dictyoneura</i>	APO	H044	16884	<i>B. humidicola</i>	APO
DT155	16191	<i>B. dictyoneura</i>	APO	H045	16885	<i>B. humidicola</i>	APO
DT157	16186	<i>B. dictyoneura</i>	APO	H047	26159	<i>B. humidicola</i>	APO
DT158	16187	<i>B. dictyoneura</i>	SEX	H048	NI	<i>B. humidicola</i>	APO
DT159	16188	<i>B. dictyoneura</i>	APO	H101	26574	<i>B. humidicola</i>	APO
DT160	16508	<i>B. dictyoneura</i>	APO	H105	NI	<i>B. humidicola</i>	APO
DT161	16509	<i>B. dictyoneura</i>	APO	H106	6013	<i>B. humidicola</i>	APO
H001	16175	<i>B. humidicola</i>	APO	H107	NI	<i>B. humidicola</i>	APO
H002	16178	<i>B. humidicola</i>	APO	H108	NI	<i>B. humidicola</i>	APO
H003	16180	<i>B. humidicola</i>	APO	R030	NI	<i>B. ruziensis</i>	SEX
H004	16181	<i>B. humidicola</i>	APO	R038	NI	<i>B. ruziensis</i>	SEX
H005	16182	<i>B. humidicola</i>	APO	R044	NI	<i>B. ruziensis</i>	SEX
H006	16867	<i>B. humidicola</i>	APO	R046	NI	<i>B. ruziensis</i>	SEX
H007	16870	<i>B. humidicola</i>	APO	R047	NI	<i>B. ruziensis</i>	SEX
H008	16871	<i>B. humidicola</i>	APO	R050	NI	<i>B. ruziensis</i>	ND
H009	16879	<i>B. humidicola</i>	APO	R100	16551	<i>B. ruziensis</i>	SEX
H010	16880	<i>B. humidicola</i>	APO	R101	26162	<i>B. ruziensis</i>	SEX
H011	16881	<i>B. humidicola</i>	APO	R102	26163	<i>B. ruziensis</i>	SEX
H012	16882	<i>B. humidicola</i>	APO	R103	26170	<i>B. ruziensis</i>	SEX
H013	16886	<i>B. humidicola</i>	APO	R105	26175	<i>B. ruziensis</i>	SEX

Table 2.1. cont.

Accession ID		Species	RM	Accession ID		Species	RM
EBC	CIAT			EBC	CIAT		
R106	26178	<i>B. ruziensis</i>	SEX	R117	26433	<i>B. ruziensis</i>	SEX
R107	26167	<i>B. ruziensis</i>	SEX	R134	NI	<i>B. ruziensis</i>	SEX
R109	26177	<i>B. ruziensis</i>	SEX				

EBC: Embrapa Beef Cattle; CIAT: International Center for Tropical Agriculture; RM: reproduction mode; NI: not identified; ND: not determined; M = cv. Marandu; P = cv. Piatã; A = cv. Arapoty. * Cultivar not yet released.

RESULTS

Microsatellites evaluation of *B. brizantha*

All primers pairs tested (total of 15) successfully amplified microsatellite loci and revealed polymorphism in *B. brizantha*, resulting in new SSRs resources for this species. Information about loci is found in table 2.2. Number of alleles scored per locus varied from two to 18 (BhUNICAMP025 and BbUNICAMP022, respectively) and PIC values ranged from 0.01 (BbUNICAMP025) to 0.79 (BbUNICAMP017). The degree of polymorphism detected by these primer pairs did not correlate with the number of repeats in the microsatellites.

All new 15 SSRs presented in table 2.2 and five loci reported previously (Jungmann et al. 2009) were used to characterize the genetic diversity in 160 accessions and five commercial

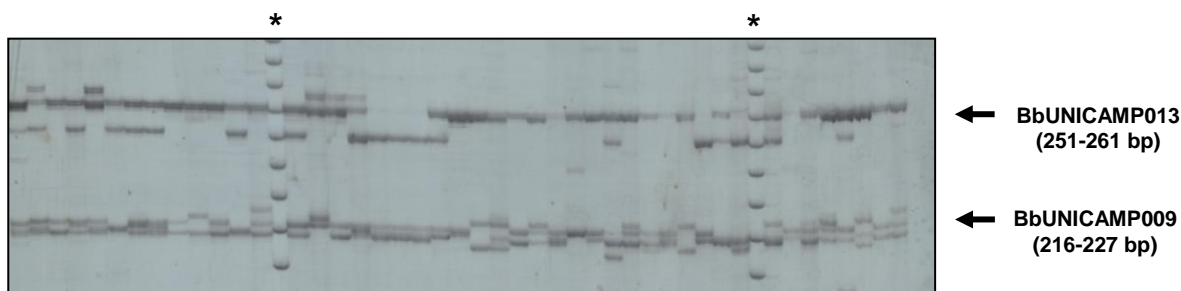


Figure 2.1. Denaturing polyacrylamide gel (6%) silver stained, showing the allele profiling of 45 accessions of *B. brizantha* with the loci BhUNICAMP009 (lower) and BhUNICAMP013 (upper). Size ranges for these loci are indicated as bp. The lanes with bands of the 10bp molecular weight marker (INVITROGEN) are indicated by asterisks (*).

Table 2.2. New microsatellites developed for *B. brizantha* and information about their use for genetic diversity assessment in *Brachiaria* spp.

SSR locus	Repeat motif	T _a (°C)	Predicted product size (bp)	No. of alleles	Size range (bp)	PIC	Primers sequences (5' - 3')	Usage of loci for diversity in <i>B. brizantha</i> *	Usage of loci for diversity in <i>Brachiaria</i> spp.**
BbUNICAMP014	(GA) ₂₅	60	215	8	194-212	0.71	ACCCGCTGCATACCCATAAT TTTTTGCCCCATCACTCTCTTTG	+	-
BbUNICAMP015	(AC) ₆	60	283	7	269-287	0.77	TGAGATGAGGCAGAACAC GGAAACTATAAAGAACAATAA	+	-
BbUNICAMP016	(GCG) ₄	60	266	5	248-274	0.62	ATGGGATAAAAGGTAACGACAC TCCAAATCACAATAAAGCC	+	-
BbUNICAMP017	(CT) ₁₀	60	222	12	188-228	0.79	GCCTCCTGCTTGCTTCTATTG GTGGCAGGTGCGTCTTGCTTC	+	-
BbUNICAMP018	(CT) ₃ T(CT) ₄ C(CT) ₂	60	199	5	190-208	0.48	TTGCAACCACGAAGAAGAAAAG CTGCGTATGCTCCCTGTCC	+	+
BbUNICAMP019	(GAA) ₄	60	223	4	220-230	0.43	AATGATGCTCATCATCCAATG CCATCAAGGTGCAAGTCAAT	+	-
BbUNICAMP020	(GCT) ₂ GCA(GCT) ₂	60	294	9	252-330	0.35	CTGACGAGGGGAGTGGAATG TCGAGTTGCTGGCAGAAGTTGG	+	+
BbUNICAMP021	(CTT)CGT(CTT) ₂ ...(CTT) ₃ (CCT)CG(CCT) ₃	55	190	7	185-201	0.32	GAAGAGGCGGATGGGACGAG CGGCGAGATGGGAGGAGACA	+	+
BbUNICAMP022	(AG) ₁₇ GG(AG) ₁₇	55	259	18	190-269	0.72	CTAGCTCCATTAAACAGGCACAA CTCCCAGCTCTCGTTTCATCTT	+	+
BbUNICAMP023	(AC) ₄ AT(AC) ₃	55	222	5	195-221	0.58	TACGACGCGCAGATTTTGTTC ACCGGTCGTCGTTGTCTCC	+	+
BbUNICAMP024	(AGA) ₂ AGG(AGA) ₂	55	267	3	260-278	0.14	TGACAAAACGGTGACAATAG ATGACTTCCCAATGACTCC	+	-
BbUNICAMP025	(TG) ₄ A(GT) ₃ (TG)(GT) ₃	55	275	2	275-280	0.01	GGAGGTGCTGTGAGGTCTTTT GTTTTCCCTGCAGGTTACATTA	+	-
BbUNICAMP026	(GAG) ₃ (GGAG) ₂	55	214	3	200-214	0.05	TATGTGCGGGCGACTTTTATG TCTTTTGCCACCGCTCTATCTA	+	-
BbUNICAMP027	(AACA) ₃	51	238	6	210-260	0.68	CTACCGGTTAATTGAAGGAAAAAG TTGTTGGTATGTTAGGAGGCAGTA	+	-
BbUNICAMP028	(CA) ₁₀	55	169	16	140-189	0.76	TTCTCCGTAATTAGCAGTGG GAAAATTCATAGGGGCAGTAG	+	+

* Five previously published loci (chapter 1, this volume) were also used for evaluation of intraspecific genetic diversity in *B. brizantha*: BbUNICAMP003, BbUNICAMP007, BbUNICAMP009, BbUNICAMP012 and BbUNICAMP013

** Locus BbUNICAMP003 (chapter 1, this volume) was also used for assessment of interespecific genetic diversity in *Brachiaria* spp.

cultivars of *B. brizantha* preserved at the EBC germplasm (table 2.1). The degree of polymorphism found for these loci within 165 genotypes was highly correlated with the degree of PIC values obtained with 23 accessions. Figure 2.1 shows the amplification pattern for two primers presented in chapter 1 (BbUNICAMP003 and BbUNICAMP013). In general, the unique sexual ecotype found in this germplasm collection (B105) revealed, over all 20 loci evaluated, a similar allele profiling to the apomictic accessions, differing from what happened with *B. humidicola* (chapter 4, this volume), in which the sexual accession H031 showed a distinct amplification pattern in some loci.

A total of 155 alleles were scored for these 20 loci. Similarity index values ranged from 0.26 (B0142 and B123) to 0.97 (B178 and B180). B002 and B247 were found to span the extremes of the dendrogram, with all other germplasm distributed in-between, with the mean genetic similarity of 0.53. Similarities involving cultivars and their original accessions were cv Aparoti/B163 (0.79); cv. Marandu/B030 (0.70); cv. Piatã/B068 (0.73).

A dendrogram was constructed with the UPGMA method. This approach successfully discriminated all accessions tested, with a unique exception for B178 and B180, which seemed to be replicates in the germplasm. The cophenetic correlation observed for this clustering pattern ($r = 0.74$) provided confidence this method was reliable for analyzing this dataset. The mean genetic similarity was established as a threshold to determine groups formed in the dendrogram. This approach revealed four groups (1, 2, 3 e 4) comprehending the majority of the genotypes (indicated by numbers in figure 2.2).

Microsatellites evaluation of *Brachiaria* spp.

Seven microsatellite loci which presented transferability to *B. decumbens*, *B. dictyoneura*, *B. humidicola* and *B. ruziziensis* were used for assessment of interspecific genetic dissimilarity in *Brachiaria*. A total of 90 alleles were scored. Jaccard's dissimilarity values varied from 0.00 (within *B. brizantha* and *B. humidicola*) to 0.96 (between *B. brizantha* and *B. humidicola*; between *B. decumbens* and *B. humidicola*) with an average of 0.61. In general, *B. humidicola* was the most dissimilar species in relation to the other four. *B. brizantha*, *B. decumbens* and *B. ruziziensis* were the most similar. Table 2.3 summarizes similarity indexes for species, isolated and combined to each other.

The PCA (figure 2.5) plot is a graphical representation of the relation between the five species studied. In general, species tended to form distinct groups. It was possible to identify a clear grouping pattern between *B. brizantha*, *B. decumbens* and *B. ruziziensis*, while *B. humidicola* was the species less related to the other evaluated. Two accessions of *B. dictyoneura* (Dt150 and Dt160) were positioned within *B. humidicola*.

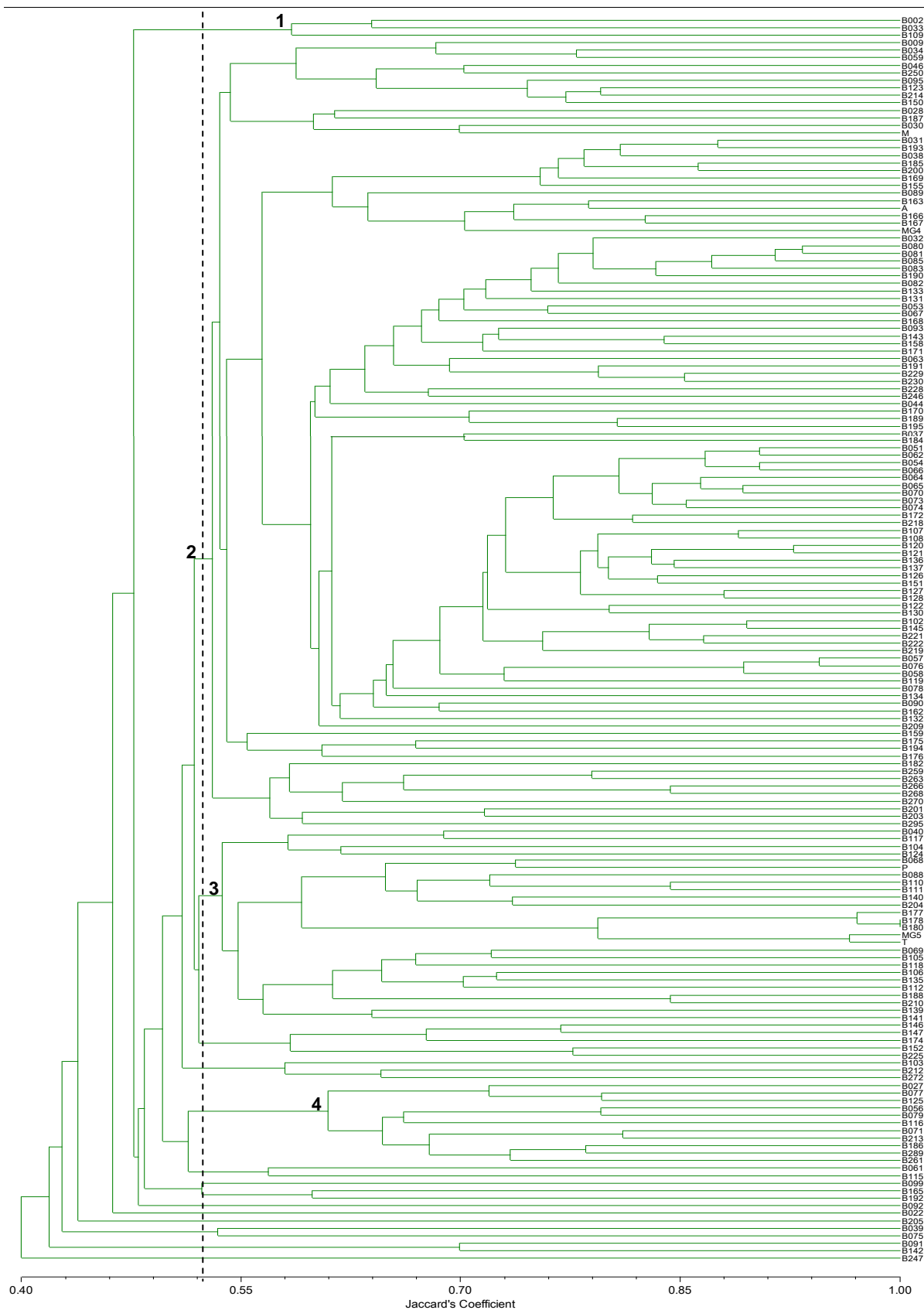


Figure 2.2. Grouping pattern revealed by the UPGMA method, based on Jaccard's similarity, for 160 accessions and six cultivars of *Brachiaria brizantha* preserved at the germplasm collection of Embrapa Beef Cattle. Accessions B178 and B180 showed the higher similarity (0.97). A, M and P correspond to cultivars Arapoty, Marandu and Piatã, respectively. The dashed line represents the average Jaccard's similarity among the 244 accessions (0.53) used as a threshold for the identification of the similarity groups.

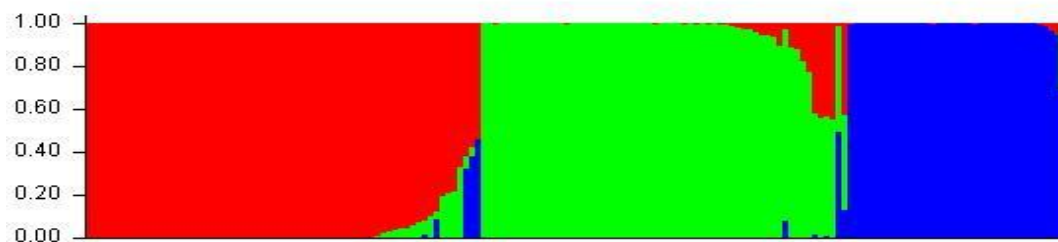


Figure 2.3. Clustering profile obtained for $K = 3$ in an analysis performed on STRUCTURE 2.2 using a no-admixture model and allele frequencies correlated. One of the 165 genotypes analyzed is represented by each vertical bar. Each color corresponds to an allelic pool. Bars with two or more colors simultaneously represent individuals that share allelic pools. In this graphic representation, individuals are clustered according to these allelic pools. The left side scale indicates membership coefficients for allocating genotypes into clusters.

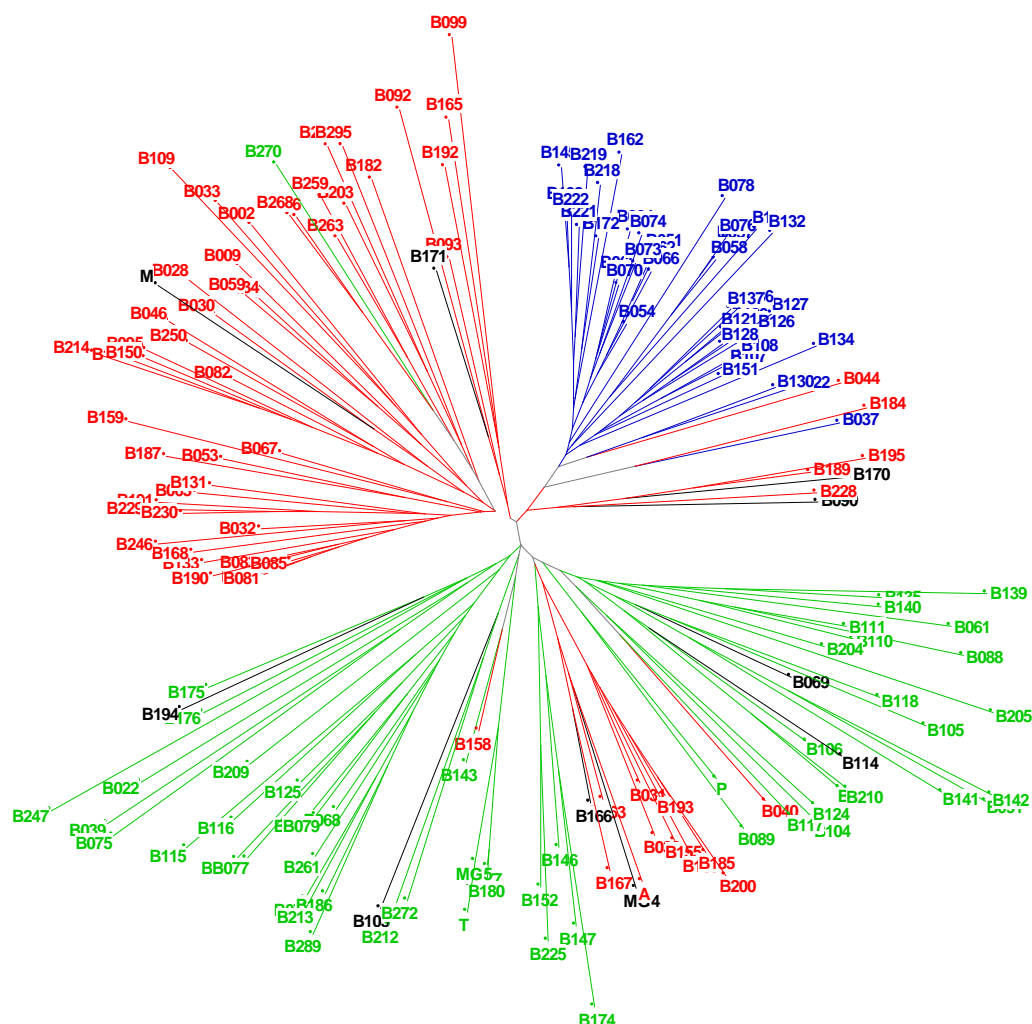


Figure 2.4. Unrooted neighbor joining tree of the 160 accessions and six cultivars of *Brachiaria brizantha*, based on Jaccard's dissimilarity. Individuals are colored according to their allocation in clusters formed by STRUCTURE (figure 2.3). Black color represents genotypes that possess more than one allelic pool in figure 2.3. Identities of biotypes are indicated in each branch.

A Bayesian analysis was conducted to infer genetic structure between species. Based on the probability of data for estimating number of likely clusters, the no-admixture model with allele frequencies independent, applied to this dataset resulted in a best K value of 5, indicating that alleles sets tended to form a number of clusters equal to the number of species. Figure 2.6 exhibits individuals allocated in clusters of allele frequencies. To verify if each set of alleles corresponded to a single species, genotypes grouped in a rooted NJ tree were colored according to STRUCTURE results (figure 2.7). *B. humidicola* was the species which presented a distinguishable allele set (shown in yellow), shared only by one accession of *B. ruziziensis* (R046) and accessions Dt150 and Dt160, which grouped within this species in figure 2.5. *B. brizantha* and *B. decumbens* overlapped three of the five allele pools identified (magenta, green and blue), while *B. dictyoneura* and *B. ruziziensis* shared one allele pool (red).

DISCUSSION

Apomictic reproduction and ploidy differences delayed the initiation of brachiariagrass breeding (Miles et al. 2004). As a consequence, most commercial cultivars yet released are products of direct selection of elite genotypes amongst the existing natural variability. One of the major germplasm collections of *Brachiaria* existing to date was introduced in Brazil in the decade of 1980 and its species have been explored through the TFBP of EBC, with the objective of producing cultivars through breeding. Although *B. brizantha* is the main source of diversity in this collection, its genetic variability has not yet been completely explored. The most extensive evaluation of interspecific genetic relationships between brachiariagrasses held at EBC was conducted by Assis et al. (2001), who used 26 vegetative, reproductive and pubescence traits in the analysis of 301 accessions of *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura*, *B. humidicola*, *B. jubata* and *B. ruziziensis*.

This work reports the development of 15 new microsatellites for *B. brizantha*. Combined with other five previously isolated SSRs resources (Jungmann et al. 2009), these markers were used to study the genetic variation within this species. The range of genetic similarity unveiled with these markers was higher (0.26 to 0.97) than the one observed by Chiari et al (2008) with RAPDs (0,70 a 0,87), who analyzed only five accessions of the same germplasm collection. Results obtained with UPGMA grouping method revealed that the variability is not strongly structured, since the threshold in the dendrogram resulted in positioning 136 individuals, out of the 165 evaluated, into the two major groups: 2 and 3 (figure 2.2). Beyond this interpretation, we assumed that the remaining individuals, together, formed a third, less defined group. This consideration was confirmed by the branching pattern observed in the NJ tree (which displayed three major groups) and also by the population structure uncovered in the Bayesian analysis conducted to infer the number of genotypes-allelic clusters (likelihood values showed K = 3 with the highest probability of occurrence). Furthermore, a strong tendency of correspondence between the Bayesian clusters and the NJ groups was observed (figure 2.4).

Table 2.3. Genetic dissimilarity in-between five species of *Brachiaria* estimated with microsatellites

		<i>B.</i> <i>brizantha</i>	<i>B.</i> <i>decumbens</i>	<i>B.</i> <i>dictyoneura</i>	<i>B.</i> <i>humidicola</i>	<i>B.</i> <i>ruziziensis</i>
<i>B. brizantha</i>	Max	0.83				
	Min	0.00				
	Mean	0.46				
<i>B. decumbens</i>	Max	0.89	0.80			
	Min	0.25	0.21			
	Mean	0.67	0.55			
<i>B. dictyoneura</i>	Max	0.94	0.95	0.62		
	Min	0.53	0.62	0.10		
	Mean	0.77	0.79	0.42		
<i>B. humidicola</i>	Max	0.96	0.96	0.84	0.80	
	Min	0.53	0.67	0.33	0.00	
	Mean	0.81	0.87	0.64	0.39	
<i>B. ruziziensis</i>	Max	0.94	0.90	0.79	0.95	0.78
	Min	0.36	0.45	0.30	0.50	0.90
	Mean	0.68	0.71	0.66	0.78	0.51

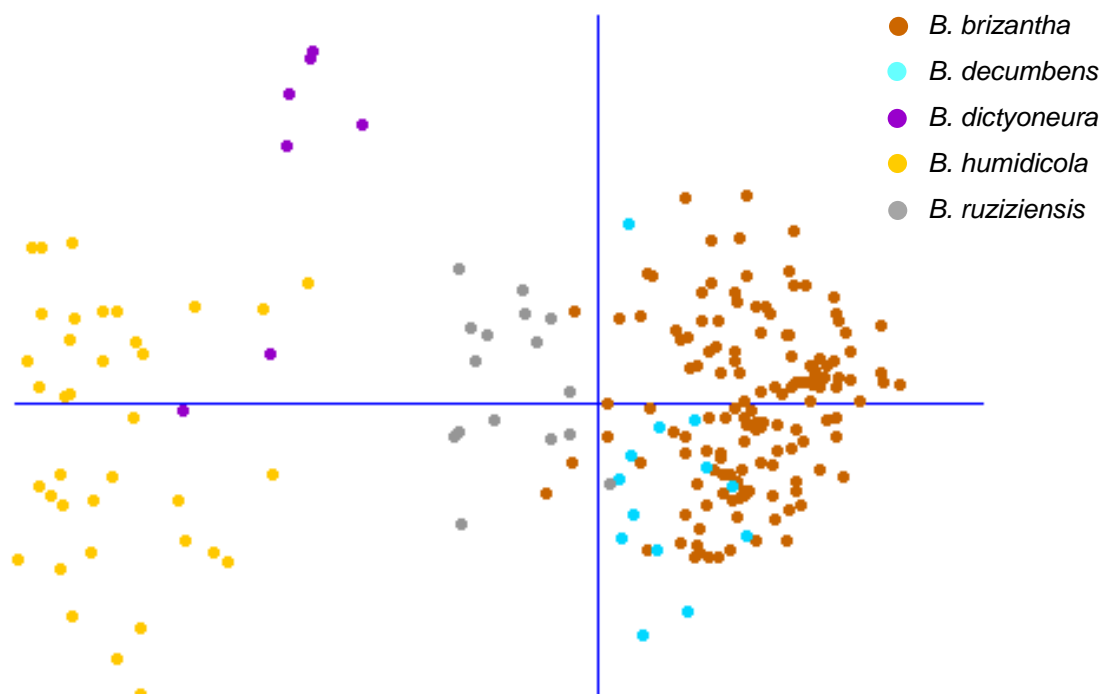


Figure 2.5. Principal coordinate analysis of microsatellite diversity in *Brachiaria*, based on the presence absence of alleles. Colors represent the five different species genotyped with microsatellites from *B. brizantha* and are indicated in the legend (right side).

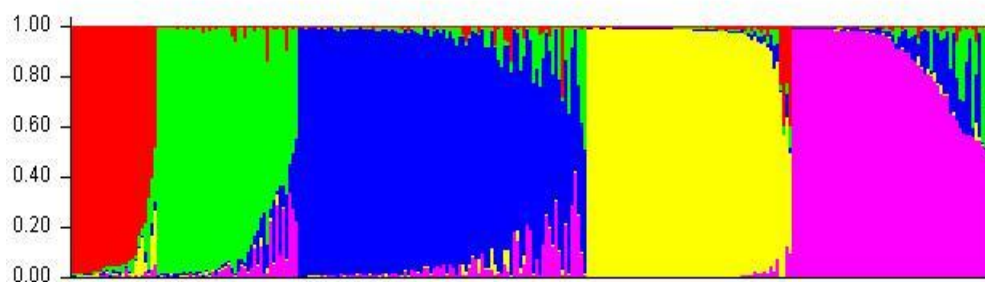


Figure 2.6. Genotypes of 165 individuals of *Brachiaria* spp. ordered by clusters formed by allele sets defined by STRUCTURE 2.2. Each of the five colors correspond to one of the allele pools identified for $K = 5$.

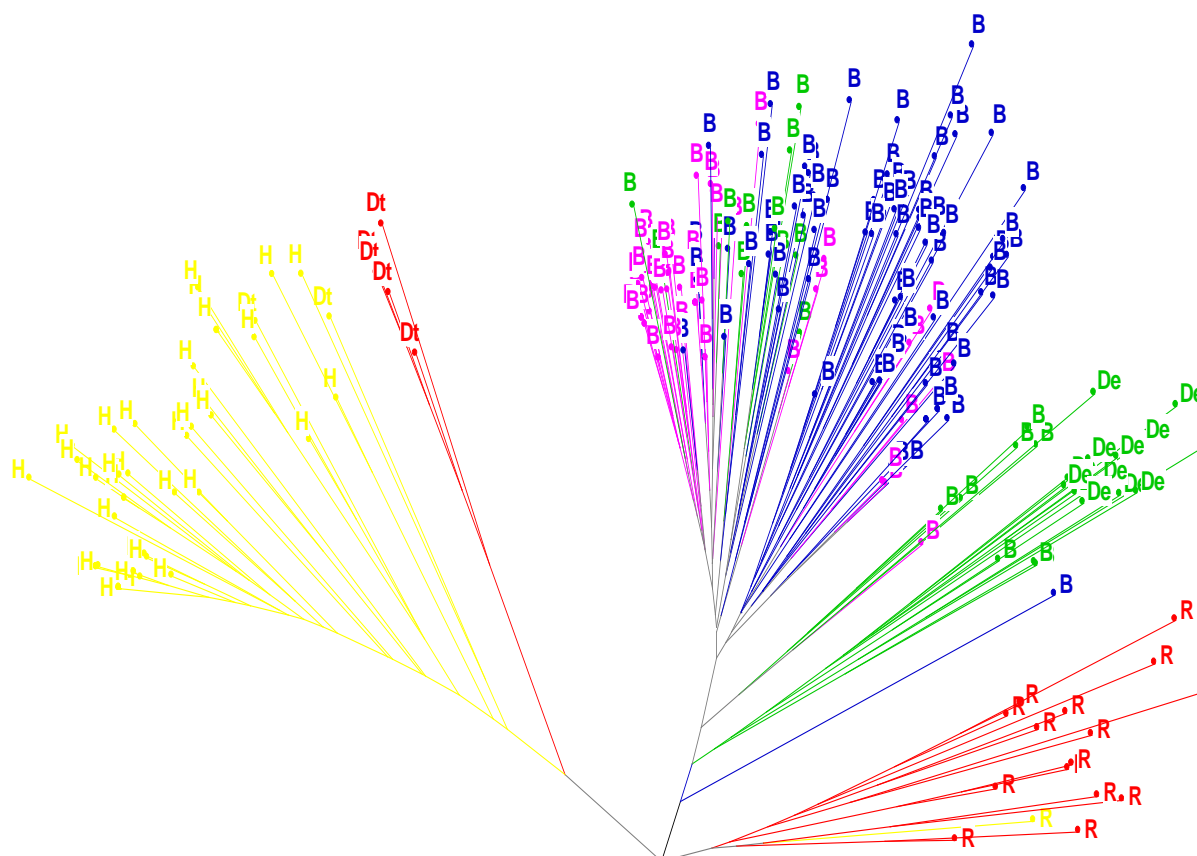


Figure 2.7. Rooted neighbor joining tree of *Brachiaria* spp., based on Jaccard's dissimilarity. Membership coefficients of individuals above 50% of probability were used to choose to color genotypes according to the scheme presented in figure 2.6.

We also used seven microsatellite loci (one of the previously reported and six newly presented here) to evaluate the interspecific relation between *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura*, *B. humidicola* and *B. ruziziensis*. The range of dissimilarities (arithmetical complements of similarities) was 0.00 (within *B. brizantha* and *B. humidicola*) to 0.96 (between *B. brizantha*-*B. humidicola* and *B. decumbens*-*B. humidicola*), while the similarity observed with RAPD by Chiari et al. (2008) for these five species varied from 0.49 to 0.87. These differences may have been observed due either to the nature of the markers used or to the distinct numbers of accessions analyzed in these two works.

These results indicate that this set of SSRs were unable to distinguish some accessions in intraspecific surveys. These seven loci were the ones developed for *B. brizantha* which resulted in less missing data for the whole set of genotypes of *B. decumbens*, *B. dictyoneura*, *B. humidicola* and *B. ruziziensis* analyzed. In order to obtain a consistent result, other loci genotyped in these four species were not included in the analysis. A look at the polymorphism content of these loci inferred from *B. brizantha* accessions reveals that four loci presented a relatively low PIC value (table 1.1, chapter 1, this volume and table 2.2, this chapter: BbUNICAMP018 = 0.48, BbUNICAMP020 = 0.35, BbUNICAMP021 = 0.32 and BbUNICAMP023 = 0.58). This low polymorphism in *B. brizantha* could possibly explain why they were the most successful in cross species amplifications. Nevertheless, they were useful in discriminating species in relation to each other.

The PCA plots showed that *B. brizantha*, *B. decumbens* and *B. ruziziensis* are the closer related species (for several axis combinations, data not shown). *Brachiaria dictyoneura* and *B. humidicola* also showed more proximity to each other than to the other species. Similar results were obtained by Assis et al. (2003). These findings corroborate with the idea that *Brachiaria* is a genus that presents agamic complexes. As discussed by Valle & Savidan (1996), an agamic complex is formed by species in a genus that are partitioned into diploid and sexual species on the one hand, and polyploid and apomictic on the other. Genetic recombination is possible within this complex, by crosses with intermediate or compatible species. In this kind of complex (in which apomixis, hybridization, polyploidization, haploidization and sexuality operate), the variation observed is often continuous, and species identification can become difficult. These authors described *B. brizantha*, *B. decumbens* and *B. ruziziensis* as an agamic complex within *Brachiaria*, while Valle (2009, personal communication) identified *B. dictyoneura* and *B. humidicola* as another.

Dissimilarity between *B. dictyoneura* and *B. ruziziensis* was considerable and varied from 0.66 to 0.79, even though the STRUCTURE 2.2 analysis allowed the identification of the same genetic background in these two species (figures 2.6 and 2.7 for reference of the species). This indicates that the survey using Bayesian analysis may have rendered genetic aspects unrevealed by the traditional methods based on similarity. Figure 2.7 was drawn assuming a

common ancestor for the five species analyzed in this work. Although one sexual accession was found in this collection both for *B. dictyoneura* and *B. humidicola*, the sampling in these two species were different and, simply considering the chance, one sexual could be expected for each eight apomictics in *B. dictyoneura*. We anticipate that further evaluations of more ecotypes of *B. dictyoneura*, both from molecular genetics and the mode of reproduction, would suggest this species as the sexual species in the agamic complex formed with *B. humidicola*. We also believe that *B. dictyoneura* and *B. ruziziensis* probably are paraphyletic as also suggested by the result obtained by Gonzalez & Morton (2005), and may have originated from a common sexual ancestor.

REFERENCES

- Ambiel AC, Guaberto LM, Vanderlei TM, Neto NBM (2008) RAPD grouping of accesses and cultivars of three *Brachiaria* species. *Acta Scientiarum-Agronomy* 30(4):457-464
- Assis GML (2001) Análise discriminante e divergência genética em espécies de *Brachiaria*. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa
- Assis GML de, Euclides RP, Cruz CD, Valle CB do (2003) Discriminação de Espécies de *Brachiaria* Baseada em Diferentes Grupos de Caracteres Morfológicos. *Revista Brasileira de Zootecnia* 32(3):576-584
- Brown JS, Schnell RJ, Power EJ, Douglas SL, Kuhn DN (2007) Analysis of clonal germplasm from five *Saccharum* species: *S. barberi*, *S. robustum*, *S. officinarum*, *S. sinense* and *S. spontaneum*. A study of inter- and intra species relationships using microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 627-648
- Cordeiro GM, Pan YB, Henry RJ (2003) Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm. *Plant Science* 165(1): 181-189
- Chiari L, Salgado LR, Valle CB do, Jungmann L, Valle JV do, Leguizamón GOC (2007) Estimativa da variabilidade genética em acessos de *Brachiaria humidicola* utilizando marcadores RAPD. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* no. 22. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande
- Chiari L, Rocha M da, Valle CB do, Salgado LR (2008) Variabilidade genética em acessos e cultivares de quatro espécies de *Brachiaria* estimada por marcadores RAPD. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* no. 24. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande
- Creste S, Tulmann Neto A, Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter* 19:299–306. doi:10.1007/BF02772828

- Dobrovolskaya O, Saleh U, Malysheva-Otto L, Roder MS, Borner A (2005) Rationalising germplasm collections: a case study for wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 111(7): 1322-1329
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11–15
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164(4): 1567-87
- Gonzalez AMT, Morton CM (2005) Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urochloa* (Poaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37(1): 36-44.
- Hua X, Guan RX, Chang RZ, Qu LJ (2005) Genetic diversity of Chinese summer soybean germplasm revealed by SSR markers. *Chinese Science Bulletin* 50(6): 526-535
- Jayamani P, Negrao S, Martins M, Macas B, Oliveira MM (2007) Genetic relatedness of Portuguese rice accessions from diverse origins as assessed by microsatellite markers. *Crop Science* 47(2): 879-886
- Jungmann L, Sousa ACB, Paiva J, Francisco PM, Vigna BBZ, Valle CB do, Zucchi MI Souza AP (2009) Isolation and characterization of microsatellite markers for *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf. *Conservation Genetics* Doi: 10.1007/s10592-009-9839-7
- Keller-Grein G, Maass BL, Hanson J (1996) Natural variation in *Brachiaria* and existing germplasm collections. In: Miles JW, Maass BL, Valle CB do (eds.) *Brachiaria: biology, agronomy and improvement*. Embrapa/CIAT, Cali, pp 16-42
- Laborda PR, Oliveira KM, Garcia AA, Paterniani ME, de Souza AP (2005) Tropical maize germplasm: what can we say about its genetic diversity in the light of molecular markers? *Theoretical and Applied Genetics* 111(7): 1288-99
- Macedo MCM (2006) Aspectos edáficos relacionados com a produção de *Brachiaria brizantha* cultivar Marandu. In: Barbosa RA (ed.) *Morte de pastos de braquiárias*. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, pp 35-36
- Machado Neto NB, Custódio CC, Peniche AGPF (2002) *Brachiaria* access germplasm distinction using SDS PAGE. *Acta Scientiarum* 24(5): 1439-1445
- Miles JW, Valle CB do, Rao IM, Euclides VP (2004) *Brachiariagrasses*. In: Al-Amoodi LK, Moser LE, Burson BL, Sollenberger LE (eds.) *Warm-Season (C4) Grasses*, Agronomy Monograph no. 45. American Society of Agronomy, Madison, pp. 745-783
- Peng JH, Bai Y, Haley SD, Lapitan NLV (2009) Microsatellite-based molecular diversity of bread wheat germplasm and association mapping of wheat resistance to the Russian wheat aphid. *Genetica* 135(1): 95-122

- Perrier X, Jacquemoud-Collet JP [Internet] DARwin: Dissimilarity Analysis and Representation for Windows (version 5.0.157). Genetic improvement of vegetatively propagated crops, CIRAD. Available from <http://darwin.cirad.fr/darwin>. Accessed on Apr-01-2009
- Pinto LR, Oliveira KM, Marconi T, Garcia AAF, Ulian EC, de Souza AP (2006) Characterization of novel sugarcane expressed sequence tag microsatellites and their comparison with genomic SSRs. *Plant Breeding* 125(4): 378-384
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(2): 945-59
- Ren FG, Lu BR, Li SQ, Huang JY, Zhu YG (2003) A comparative study of genetic relationships among the AA-genome of *Oryza* species using RAPD and SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics* 108(1): 113-120
- Rohlf FJ (1997) NTSYS-PC: numerical taxonomy and multivariate analyses systems. Exeter Software, New York
- Rungis D, Llewellyn D, Dennis ES, Lyon BR (2005) Simple sequence repeat (SSR) markers reveal low levels of polymorphism between cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars. *Australian Journal of Agricultural Research* 56(3): 301-307
- Torres Jr AM, Rosa FRT, Nogueira MP (2004) Mais boi em menos pasto. *Revista de Agronegócios da FGV* agosto (2004)
- Valle CB do, Savidan YH (1996) Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*. In: Miles JW, Maass BL, Valle CB do (eds.) *Brachiaria: biology, agronomy and improvement*. Embrapa/CIAT, Cali, pp 147-163
- Valle CB do, Simioni C, Resende RMS, Jank L (2008) Melhoramento genético de *Brachiaria*. In: Resende RMS, Valle CB do, Jank L (eds.) *Melhoramento de Forrageiras Tropicais*. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, pp 13-54
- Xu YB, Beachell H, McCouch SR (2004) A marker-based approach to broadening the genetic base of rice in the USA. *Crop Science* 44(6): 1947-1959
- Yoon MS, Lee J, Kim CY, Kang JH, Cho EG, Baek HJ (2009) DNA profiling and genetic diversity of Korean soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) landraces by SSR markers. *Euphytica* 165(1): 69-77

CAPÍTULO 3

Development of microsatellite markers for *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick.

Keywords: *Urochloa humidicola*, koroviniagrass, SSRs, taxonomy, genetic diversity

Abstract

The first panel of nuclear simple sequence repeats (SSRs) loci for *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick. is described and was obtained using an enriched-library methodology. Thirty eight pairs of primers were tested and 27 revealed polymorphism in 58 accessions of the Germplasm Collection of *Brachiaria humidicola* held at Embrapa Beef Cattle, Brazil. Eleven loci amplified in *B. dictyoneura*, a closely related species with unclear taxonomic boundaries with *B. humidicola*. Transferability to other three species of *Brachiaria* was also evaluated. The microsatellites developed are useful for genetics studies of *B. humidicola* relationship with its correlated species, and also for conservation and breeding applications.

Brachiaria (Trin.) Griseb. is a large genus of grasses that belongs to the tribe Paniceae, subfamily Panicoideae of the Poaceae family, and contains about 100 species distributed throughout the Tropics. Species included in this taxon present very unclear taxonomic relationships with the related genera *Urochloa*, *Eriochloa* and *Panicum*, as largely discussed since *Brachiaria* was elevated to the category of genus by Grisebach (1853).

Brachiaria humidicola (Rendle) Schweick. is an African perennial stoloniferous species that reproduces by aposporous apomixis. According to W³TROPICOS, the nomenclatural database of the Missouri Botanical Garden, it has been classified as *U. dictyoneura* (Fig. & De Not.) Veldkamp by Veldkamp (1996); as *B. dictyoneura* subspecies *humidicola* (Rendle) Catasús by Catasús Guerra (2001) and *U. humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga by Zuloaga and Morrone (2003)¹⁰. In fact, it is closely related to *B. dictyoneura* (Fig. & De Not.) Stapf, and these two species, at times, have been confused. This disputable allocation of *B. humidicola* is, in part, a consequence of taxonomic studies based on morphological descriptors. González and Morton (2005) have reviewed relationships of *Brachiaria*, *Urochloa* (including *U. humidicola*, since authors adopted the classification of Morrone & Zuloaga 1992), *Eriochloa*, and six other species of Paniceae using ITS markers. Besides this work, no investigation using specific/genome spread markers has been reported.

In this manuscript, we describe the first panel of microsatellites (hereafter also mentioned as SSRs) isolated from *B. humidicola*, some of which could be transferred to other *Brachiaria* species. We expect these molecular resources will be useful to elucidate phylogenetic aspects within this taxon, and also for conservation and breeding studies.

Freeze-dried leaf samples were used to extract genomic DNAs using the cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) method (Doyle & Doyle 1987). Construction of the genomic library was carried out with one genotype of *B. humidicola*, following the methodology of Billotte et al. (1999), according to the specifications of Jungmann et al. (2009). ABI 377 automated sequencer (PE Applied Biosystems) and the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) were used to sequence a total of 384 clones. Thirty eight pairs of primers designed with the software Primer Select 5.01 (DNASTAR Inc.)

¹⁰ Although Zuloaga and Morrone (2003) allocated *B. humidicola* in the genus *Urochloa* and this happen to be the latest botanical classification for this taxon, the name *B. humidicola* was chosen for reference to this species in this paper due to its recognition for over 100 years and to its relation to economically important pastures in tropical America.

Table 3.1 Description of SSR markers developed for *Brachiaria humidicola*

SSR locus	Repeat motif	T _a (°C)	Predicted product size (bp)	Primers sequences (5' - 3')	Characteristics in <i>B. humidicola</i>			Transferability ^{1,2}			
					No. of bands	Size range (bp)	PIC	<i>B.</i> <i>brizantha</i>	<i>B.</i> <i>decumbens</i>	<i>B.</i> <i>dictyoneura</i>	<i>B.</i> <i>ruzizensis</i>
BhUNICAMP001	(GA) ₅	60	248	CATAGAAGCTCCTCAATGTGTTT GATGGATATGGATGGGTGTAAT	9	248-268	0.79	0/3	0/3	2/8	0/3
BhUNICAMP002	(GT) ₃ ...(CTT) ₃ ...(GT) ₇ ...(CT)	60	251	AGCCATACCTCCTTGTGT AGCTCTTGATACCACTTGTTAG	8	236-264	0.72	1/3	3/3	7/8	0/3
BhUNICAMP003	(AC) ₆ ...(AT) ₃ ...(AT) ₃	60	193	CTGTGAGCATGGTTCATAATAA GCATCGAATAAAGCTCAGAAAG	17	174-204	0.79	3/3	3/3	8/8	0/3
BhUNICAMP004	(GT) ₁₀ ...(GT) ₃	60	231	AGTTTGCTGCCTCTTTGATT GTGGCGCTACCTTCTTG	10	230-260	0.81	1/3	2/3	5/8	0/3
BhUNICAMP005	(CA) ₅ T(AC) ₃	62	205	CACTGCATCAACTACCCACCAC GCTGCTTTGCTTGCCTTACCT	12	180-218	0.86	3/3	2/3	8/8	2/3
BhUNICAMP006	(TTTG) ₄	48	226	ATGAAGAAGCGCGATAAAT AGCTGACCCCGATAACTG	7	196-218	0.64	0/3	0/3	0/8	0/3
BhUNICAMP007	(TG) ₁₆ ...(GCA) ₄	57	201	CTAGGCAACAAGCACTCAAAA GCACCACAACCTCATAGCAGAT	10	179-212	0.61	0/3	0/3	0/8	0/3
BhUNICAMP008	(GA) ₁₈	60	264	AACAGAATAACTGCGAGAAGG ACTGAGCCGGTTGGAAATA	9	248-278	0.56	1/3	0/3	6/8	0/3
BhUNICAMP009	(AG) ₈	57	211	GGCTCTCGCTGGTCTGAAT TGTGCTAGGCTCGGGAATAC	9	210-250	0.78	0/3	0/3	0/8	0/3
BhUNICAMP010	(TG) ₆	55	198	GGGTTCTGTCGTCGTTTCTT CAGTTGACCTACACCGCTACAC	13	172-202	0.81	0/3	0/3	8/8	0/3
BhUNICAMP011	(TA) ₅	57	193	ACGTTAACTTTCCCGTTCT TGCTAAATATGATCGCCAACT	4	192-198	0.55	0/3	0/3	1/8	0/3
BhUNICAMP012	(GT) ₅ G(GA) ₅	60	166	TGGGTCAGCCGAAAACCT TCGCCTTACTACGTCTGTCTCA	11	160-182	0.74	2/3	2/3	2/8	2/3
BhUNICAMP013	(TCA) ₆	60	205	TTTCTCGCCCTTTGTCTCT TTCATACCTCCACTGCCTCTAA	5	187-208	0.70	0/3	0/3	2/8	0/3
BhUNICAMP014	(AC) ₆ AT(AC) ₄	57	262	GGAGTATGTGCTATGATTATGT CAAAGGTCCTATTCGTGA	9	250-264	0.77	0/3	0/3	2/8	0/3
BhUNICAMP015	(GT) ₈	60	269	AGGGGAGAACTGTGGTGGTGT TCGAGTTTTGAGGGTGGGATTG	8	248-272	0.73	0/3	0/3	2/8	3/3
BhUNICAMP016	(CT) ₆ (AT) ₆ (GT) ₉	60	266	CATGCGTAGCCCCACTGT GCTTTCCTTCATGTTCTATCC	21	260-320	0.95	3/3	0/3	2/8	0/3
BhUNICAMP017	(GT) ₃ GA(GT) ₃	60	219	ACTGCTTCTCGATGCTGTG GTGTTTACGATGCCCTGAG	2	218-222	0.06	1/3	3/3	8/8	0/3
BhUNICAMP018	(AC) ₃ TC(AC) ₄	62	197	TCCATATCCAACAAGGCAACAT GCGCGAGCTGGTGAAGT	9	190-210	0.82	3/3	3/3	8/8	0/3

Table 3.1 *cont.*

SSR locus	Repeat motif	T _a (°C)	Predicted product size (bp)	Primers sequences (5' - 3')	Characteristics in <i>B. humidicola</i>			Transferability ^{1,2}			
					No. of bands	Size range (bp)	PIC	<i>B.</i> <i>brizantha</i>	<i>B.</i> <i>decumbens</i>	<i>B.</i> <i>dictyoneura</i>	<i>B.</i> <i>ruzizensis</i>
BhUNICAMP019	(AAAAC) ₃ ...(CT) ₁₇	60	262	ATGAGAGGGAAGGAAGGGTAGA CTTAAAGTGGGTCAAGTGTCTGTC	29	250-340	0.94	0/3	0/3	8/8	0/3
BhUNICAMP020	(GCCG) ₃ ...(AC) ₉	60	231	CCGGCCGGTTCAGTCGT GGCACTCGGACTCCCACTAATC	14	220-256	0.81	3/3	3/3	8/8	3/3
BhUNICAMP021	(AG) ₁₈	60	311	TCACATGCTGCGAAGAAT GCCATGTCCTCAGTTGTTT	17	268-330	0.86	2/3	2/3	8/8	2/3
BhUNICAMP022	(AG) ₁₇	60	223	TTAAGCAATGAGGAAGTGTGGA ATGTTTTCAAGTGGAGGGTTCT	15	190-242	0.83	0/3	0/3	8/8	0/3
BhUNICAMP023	(CA) ₇	60	288	AGGCGTTGTATCTCCGTCGTCT GGCTCACTCACTTCCCACTG	10	230-310	0.77	NE	NE	NE	NE
BhUNICAMP024	(CA) ₇	60	194	TCAATGTCGCTCAGAAT GACACTTTTCGTTCAATG	9	186-206	0.66	NE	NE	NE	NE
BhUNICAMP025	(TC) ₃ (TG) ₅ (AG) ₅	60	184	GAGAGTGGGGTGCTATCAT GACAGAGGGCGTATCACAT	18	168-246	0.90	2/3	2/3	8/8	2/3
BhUNICAMP026	(GT) ₇	60	233	CCTCCACGGGTACTTCAAA AAATATCCGAGCTCCAACATC	16	214-238	0.85	0/3	0/3	3/8	0/3
BhUNICAMP027	(CT) ₁₆	60	199	CATTGGTCTGGCTTTGATTG TGCACCTCCCTTGATGACTTAC	22	166-214	0.94	1/3	2/3	8/8	2/3

NE: not evaluated

¹ Number of genotypes successful amplified/Number of genotypes tested

² Nomenclatural classification: *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf
Brachiaria decumbens Stapf
Brachiaria dictyoneura (Fig. & De Not.) Stapf
Brachiaria ruzizensis Germain & Evrard

were assayed in 58 genotypes of *B. humidicola* from the germplasm collection of Embrapa Beef Cattle¹¹. PCR reactions were performed in a MJ Research PTC-100™ thermocycler in a 25 µl final volume of buffer [20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl and 1,5 mM MgCl] containing 50 ng of genomic DNA, 0,8 µM of each primer, 150 µM dNTPs and 1 U *Taq* DNA polymerase. The PCR program consisted of a initial denaturing step at 94° C for 1 min followed by 30 cycles of amplification [94° C (1 min), X° C (1 min), 72° C (1 min)] and a final elongation step at 72° C for 7 min, being X° C the annealing temperature (T_a) for amplifying each locus (table 3.1). Amplification products were resolved by electrophoresis in 3% agarose and 6% denaturing polyacrylamide gels, silver stained according to Creste et al. (2001).

From the total of 38 SSRs tested, 36 amplified successfully in *B. humidicola* and 27 were polymorphic (shown in table 3.1). Polymorphism Information Content (PIC) values for each locus was obtained according to Cordeiro et al. (2003) for the 58 accessions of *B. humidicola*. Mean PIC over all loci was 0.75. Loci BhUNICAMP016, BhUNICAMP019 and BhUNICAMP027 showed the highest PIC values (0.95, 0.94 and 0.94 respectively), indicating that they are the most informative loci in this panel of SSRs. Locus BhUNICAMP017 showed a very low PIC value (0.06), as expected due to its low number of bands (2) and to the fact that one of these bands was present only in one genotype, while the other was present in all genotypes (data not shown).

Transferability was tested on *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura* and *B. ruziziensis* for 25 loci in the same PCR conditions used for *B. humidicola*. Number of genotypes successfully amplified/number of genotypes tested per species is indicated in table 3.1. Loci BhUNICAMP006, BhUNICAMP007 and BhUNICAMP009 didn't amplify in any genotype tested. In general, higher success in transferability was obtained for *B. dictyoneura* (22 loci were transferred to at least one genotype. From these transferred loci, 13 presented positive amplification reactions in more than 75% of individuals evaluated). These results were expected since *B. dictyoneura* is closer to *B. humidicola* than the other three species (Renvoize et al. 1996; González and Morton 2005). *B. ruziziensis* was the scoreless species (only seven loci could be transferred).

These findings indicate that the SSR markers reported here represent powerful genetic resources that can be used on further studies of genetic diversity and mapping, comprising not only *B. humidicola*, but also other species of *Brachiaria*.

¹¹ Center for Beef Cattle Research of the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa)

Acknowledgements

Authors would like to thank Felipe Rodrigues da Silva for bioinformatics support for the project. This work was realized with grants from Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa), Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), State of São Paulo Research Foundation (Fapesp) and Foundation for Science and Technological Development of the State of Mato Grosso do Sul (Fundect).

REFERENCES

- Billotte N, Lagoda PJR, Risterucci AM, Baurens FC (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54: 277-288
- Catasús Guerra L (2001) De Poaceis Cubensibus Notulae, III (In: *Floram Novam Cubensem Stvdia Intendentia*). *Fontqueria* 55(4): 15-17
- Cordeiro GM, Pan YB, Henry RJ (2003) Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm. *Plant Science* 165(1):181-189
- Creste S, Tulmann Neto A, Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 299-306
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19: 11–15
- Gonzalez AMT, Morton CM (2005) Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urochloa* (Poaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37(1): 36-44
- Grisebach A (1853) Gramineae. In: Ledebour CF (ed.) *Flora Rossica*, vol 4. Sumptibus Librariae E. Schweizerbart, Stuttgart, pp 324-484
- Jungmann L, Sousa ACB, Paiva J, Francisco PM, Vigna BBZ, Valle CB do, Zucchi MI, Souza AP (2009) Isolation and characterization of microsatellite markers for *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf. *Conservation Genetics* Doi:10.1007/s10592-009-9839-7
- Renvoize SA, Clayton WD, Kabuye CHS (1996) Morphology, taxonomy, and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb.. In: Miles JW, Maass BL, Valle CB do (eds.) *Brachiaria: Biology, Agronomy and Improvement*. Embrapa/CIAT, Cali, pp. 1-15
- Veldkamp JF (1996) *Brachiaria*, *Urochloa* (Gramineae---Paniceae) in Malesia. *Blumea* 41(2): 413-437

Zuloaga FO, Morrone O (2003) *Urochloa*. In: Catalogue of New World Grasses (Poaceae): III. Subfamilies Panicoideae, Aristidoideae, Arundinoideae, and Danthonioideae. Contributions from the United States National Herbarium 46: 629-634

CAPÍTULO 4

A survey of the Brazilian germplasm collection of the tropical pasture *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick. [Koroniviagrass] using microsatellite markers, cytogenetics, morphological traits and geographical origin

Keywords: Creeping signal grass, *Brachiaria*, Microsatellites

ABSTRACT

Brachiaria humidicola (Rendle) Schweick. is a warmseason grass with facultative apomixis and variation in ploidy levels. Accessions of this species were collected in Eastern Africa and massively introduced into America in the decade of 1980's to be used as forage because of its high adaptation to poorly drained soils. Fifty eight of these accessions were imported to a Brazilian germplasm collection, and have been agronomically evaluated in the last decades. Two commercial cultivars, not yet released, were direct selected from the germplasm. Apomixis, ploidy and the low level of knowledge of genetic diversity in this germplasm collection has caused the breeding program established at Embrapa Beef Cattle to face many barriers. To date, no molecular marker specific to *B. humidicola* has been reported. The aim of this work was to use the first panel of microsatellite markers developed to this species in order to characterize the genetic variability found in this germplasm collection and to compare the results obtained with information about 1) collection sites of the accessions; 2) previously determined reproduction mode and ploidy levels and 3) the genetic diversity revealed by morphological markers. Data obtained from genotyping was used for inferring population structure and similarity relationships between accessions and two cultivars of *B. humidicola*. Results indicate that this germplasm population is well structured into four main groups, characterized by distinct allele frequencies, and that the sole sexual accession did not group with any of the clusters formed. It presented an admixture of allele pools distinct from most allele pools found in the main clusters. Genetic dissimilarities did not correlate with either geographic distances or genetic distances inferred from morphological descriptors. Some individuals presented a slight tendency to group according to ploidy levels, but this observation could not be extrapolated to the whole germplasm collection. We identified exclusive alleles both for the sexual accession and for the apomictic ones, suggesting that further evaluation of the relation of these loci to apospory shall be carried out.

INTRODUCTION

Koroniviagrass is one of the vernacular names adopted in the New World for a species strongly characterized as a perennial stoloniferous plant presenting narrow, wiry stems, and narrow, glabrous leaves (Miles et al. 2004), which has Eastern Africa as the center of origin and dispersion. It is also commonly known as creeping signal grass; false creeping paspalum; braquiaria dulce, Amazonian kikuyu and humidicola pasture.

It belongs to the group of brachiariagrasses, formed by many species included in *Brachiaria* by Grisebach (1853), who created this genus with several species primarily considered a section of *Panicum* by Trinius (1826). Its taxonomic allocation is very controversial, as it is for the genus *Brachiaria* itself. *Brachiaria* presents poorly defined boundaries when compared to the closely related genera *Urochloa*, *Eriochloa* and *Panicum*. Nomenclatural classification for its species has been largely discussed over years, as reviewed by Gonzalez & Morton (2005). Several species have been transferred to *Urochloa* and re-circumscribed into *Brachiaria*, and no consensus is found in the literature. A recent phylogenetic analysis based on polymorphisms of the internal transcribed spacer region of nuclear ribosomal DNA suggested *Brachiaria-Urochloa*, as a complex, paraphyletic with *Eriochloa* (Gonzalez & Morton 2005).

Brachiaria humidicola (Rendle) Schweick. is a good example of this disputable taxonomy and, over time, has been classified as *U. dictyoneura* (Fig. & De Not.) Veldkamp (Veldkamp 1996); as *B. dictyoneura* subspecies *humidicola* (Rendle) Catasús (Catasús Guerra 2001) and *U. humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga (Morrone & Zuloaga 1992). In fact, sometimes, it has been confused with *B. dictyoneura* (Fig. & De Not.) Stapf by agronomists. Since the limits between *Brachiaria* and *Urochloa* have not yet been clearly defined, the binomial *B. humidicola* was chosen as a reference to koroniviagrasses in this manuscript, due to its recognition for over 100 years and to its relation to economically important forage crops in tropical America.

Brachiaria humidicola naturally occurs in areas of infertile and poorly drained soils or with seasonal flooding. For this reason, it has been largely explored in the Tropics as a forage option to other brachiariagrasses, mostly adapted to the dry African savannas and similar environments such as the Brazilian cerrados. Its wide use as pastures was possible due to its massive introduction into South America after a plant collection expedition realized by the International Center for Tropical Agriculture (CIAT) with the collaboration of the International Livestock Center for Africa (ILCA) in the middle of the 1980s, an initiative supported by the Biodiversity International (so called International Plant Genetic Resources Institute - IPGRI). Amongst all species collected, it takes the second place in area of occupation in Africa. Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa) imported 58 accessions out of the 64 held at CIAT, collected in an extensive N-S range of eastern African countries (Burundi, Ethiopia, Tanzania, Zambia and

Zimbabwe). Since that, field agronomic evaluations and breeding were established by the Tropical Forages Breeding Program at Embrapa Beef Cattle (EBC)¹².

Aposporous pseudogamous apomixis is the predominant reproduction mode in this germplasm collection (Valle 1990). Although apomixis is facultative, in most genotypes it prevails over sexuality. Sexual biotypes analyzed to date are hexaploids, while apomictics present ploidy varying from hexa to nonaploids (Pagliarini, personal communication).

The genetic characterization of elite germplasm is a central requirement to successful breeding programs. As a complement to agronomic and basic biology evaluation, molecular methods based on DNA have raised as a powerful tool to access the available variability (Nybohm 1994; Zhang et al. 1999), since they are not subjected to environmental effects. In *B. humidicola*, the first study to characterize the genetic diversity within an entire germplasm collection with a molecular tool was carried out by Chiari et al (2007), who worked with RAPD markers. Since that, we have described the development of a set of microsatellite markers as the first panel of specific molecular markers for *B. humidicola* (chapter 3, this volume). In this manuscript we report the use of these microsatellite loci in the genetic characterization of the whole germplasm collection of Koroniviagrass held at EBC. Geographical origin of accessions was considered, as well as ploidy levels. The correlation between genetic diversity accessed by microsatellites and morphological descriptors is also discussed.

MATERIALS AND METHODS

Plant Materials

Fifty eight accessions and two commercial cultivars from the *Brachiaria* germplasm collection at EBC were analyzed with microsatellite markers. From these, 34 accessions had morphological descriptors recorded by Assis (2001). Table 4.1 summarizes information of all 58 accessions numbers (as recorded at EBC and CIAT collections) and the 2 cultivars: Tupi (yet to be released) and Common Humidicola (hereafter also mentioned as COM). When available, mode of reproduction, total number of chromosomes, estimated ploidy, country where the material was collected and geographical coordinates of collection sites are also shown. Data concerning number of chromosomes and ploidy inferred with cytogenetical analyses was kindly provided by Pagliarini MS and Boldrini KR (Department of Cell Biology and Genetics, State University of Maringá, Brazil).

¹² The Center for Beef Cattle Research of the Brazilian Agricultural Research Corporation

Table 4.1. Overall information about accessions

ID						GEO (decimal degrees)				
EBC	CIAT	AN	REP	CN	PL	COUNTRY	LAT	LON	MOR	MNAS
H001	16175	1	APO	2n=36	6X	Ethiopia	9.750	35.150	N	6
H002	16178	2	APO	2n=36	6X	Ethiopia	6.900	38.450	N	4
H003	16180	3	APO	2n=42	ND	Ethiopia	5.867	39.133	N	6
H004	16181	4	APO	2n=42	ND	Ethiopia	5.817	39.267	N	6
H005	16182	5	APO	2n=36	6X	Ethiopia	6.683	37.783	Y	5
H006	16867	6	APO	2n=54	9X	Zimbabwe	-18.017	30.550	Y	6
H007	16870	7	APO	2n=36	6X	Zimbabwe	-17.350	31.533	Y	5
H008	16871	8	APO	2n=54	9X	Zimbabwe	-17.167	31.067	Y	6
H009	16879	9	APO	2n=54	9X	Zimbabwe	-18.433	32.133	Y	6
H010	16880	10	APO	2n=54	9X	Zimbabwe	-18.283	32.717	N	5
H011	16881	11	ND	ND	ND	Zimbabwe	-18.117	31.833	N	6
H012	16882	12	APO	2n=54	9X	Zimbabwe	-18.150	31.817	N	5
H013	16886	13	APO	2n=36	6X	Zimbabwe	-20.233	31.400	Y	5
H014	16889	14	APO	2n=54	9X	Zimbabwe	-19.983	30.767	Y	7
H015	26141	15	ND	2n=36	6X	Burundi	-4.233	29.783	N	6
H016	26149	16	APO	2n=36	6X	Burundi	-4.233	29.783	N	7
H017	26154	17	APO	2n=36	6X	Burundi	-3.150	30.150	N	6
H018	26155	18	APO	2n=36	6X	Burundi	-3.517	29.967	Y	6
H019	16350	19	APO	2n=36	6X	Ethiopia	11.367	37.033	N	6
H021	16868	20	APO	2n=54	9X	Zimbabwe	-17.883	30.717	Y	6
H022	16874	21	APO	2n=54	9X	Zimbabwe	-16.533	29.567	Y	6
H023	16877	22	APO	2n=54	9X	Zimbabwe	-16.700	29.767	N	6
H024	16878	23	APO	2n=54	9X	Zimbabwe	-18.183	31.967	Y	5
H025	16883	24	APO	2n=54	9X	Zimbabwe	-18.683	32.633	N	5
H026	16887	25	APO	2n=36	6X	Zimbabwe	-20.083	31.150	Y	9
H027	16888	26	APO	2n=36	6X	Zimbabwe	-20.283	31.533	Y	7
H028	16890	27	ND	2n=54	9X	Zimbabwe	-19.450	30.633	Y	8
H029	16892	28	APO	2n=54	9X	Zimbabwe	-18.783	27.000	Y	7
H030	16894	29	APO	2n=42	ND	Zimbabwe	-18.867	27.183	N	8
H031	26146	30	SEX	2n=36	6X	Burundi	-3.983	30.033	Y	8
H033	26407	31	APO	2n=54	9X	Tanzania	-7.767	35.883	Y	7
H034	26411	32	APO	2n=36	6X	Tanzania	-8.100	35.433	Y	4
H035	26413	33	APO	2n=54	9X	Tanzania	-8.417	35.333	Y	7
H036	26414	34	APO	2n=54	9X	Tanzania	-8.583	35.150	Y	7
H037	26415	35	APO	2n=54	9X	Tanzania	-8.517	35.067	Y	6
H038	26416	36	APO	2n=54	9X	Tanzania	-9.100	34.817	N	8
H039	26427	37	APO	2n=36	6X	Tanzania	-9.400	33.817	Y	5
H040	26430	38	APO	2n=36	6X	Tanzania	-9.450	33.850	Y	5
H041	26432	39	APO	2n=36	ND	Tanzania	-8.783	33.567	Y	5
H042	16866	40	APO	2n=54	9X	Zimbabwe	-17.667	31.283	Y	6
H043	16869	41	ND	2n=36	6X	NA	NA	NA	N	5
H044	16884	42	APO	2n=54	9X	Zimbabwe	-18.833	32.533	Y	6
H045	16885	43	APO	2n=36	6X	Zimbabwe	-20.150	32.617	Y	5
H046	26145	44	APO	2n=36	6X	Burundi	-3.200	30.550	N	4
H047	26159	45	APO	2n=36	6X	NA	NA	NA	Y	6
H048	NA	46	APO	2n=42	ND	NA	NA	NA	N	5
H101	26574	47	ND	2n=54	9X	South Africa	NA	NA	N	7
H105	NA	48	APO	2n=54	ND	NA	NA	NA	Y	8
H106	6013	49	APO	2n=54	9X	South Africa	NA	NA	Y	6
H107	NA	50	APO	2n=54	9X	NA	NA	NA	Y	7
H108	NA	51	APO	2n=54	9X	NA	NA	NA	Y	7
H112	6705	52	APO	2n=54	9X	NA	NA	NA	Y	7
H118	16774	53	ND	ND	ND	NA	NA	NA	N	5
H119	26130	54	APO	ND	ND	NA	NA	NA	N	8
H121	26371	55	APO	2n=54	9X	Tanzania	-8.350	35.300	N	8
H124	26438	56	APO	2n=54	9X	NA	NA	NA	Y	7
H125	6133	57	APO	ND	ND	Zambia	-10.150	31.833	N	5
H126	6369	58	APO	2n=42	ND	NA	NA	NA	N	5
COM	NP	59	APO	ND	ND	NP	NP	NP	N	5
Tupi	NP	60	APO	ND	ND	NP	NP	NP	N	6

ID: Identification of cultivars and accessions at Embrapa Beef Cattle (EBC) and CIAT; AN: annotated number for analysis in STRUCTURE (figure 4.3); REP: mode of reproduction; CN: chromosome numbers; GEO: geographical coordinates; LAT: latitude; LON: longitude; MOR: if accessions were analyzed by Assis (2001) with 26 morphological traits (Y: yes; N: no). MNAS: maximum number of alleles scored in one locus, along all loci. NA: not available; ND: not determined. NP: not pertinent
Chromosome counts and ploidy provided by Dr. Maria Suely Pagliarini and Dr. Kellen Boldrini (Department of Cell Biology and Genetics, State University of Maringá, Brazil).

Genotyping microsatellite markers

Fifty-eight accessions and the cultivars Tupi and COM from the germplasm collection of EBC were evaluated. Freeze-dried leaf of all samples were used to extract genomic DNAs using the cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) method (Doyle & Doyle 1987). A total of 27 pairs of primers were assayed following the specifications described in chapter 3. Because of the elevated ploidy level of the material (table 4.1), allelic dosage could not be estimated and microsatellites were scored as presence/absence of bands.

Analyses of population structure and genetic diversity using microsatellite markers

Genotyping was evaluated in a Bayesian clustering approach with the software STRUCTURE version 2.2 (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003; Falush et al. 2007). Admixture and no-admixture models were tested with 500,000 replicates for burn-in and 500,000 replicates for Markov Chain Monte Carlo processes and 5 iterations (runs). K numbers of clusters were tested from 1 to 10. Analyses were done using both allele frequencies correlated and allele frequencies independent between clusters for the two models tested. For determining the best K, standard deviations of the likelihood values for each K (K_{SD}) along the 5 runs were compared with ΔK values estimated according to (Evanno et al. 2005).

Pairwise similarity and dissimilarity matrices were obtained from Jaccard's coefficients (dissimilarity resulted from the arithmetical complement of similarity) calculated for each pair of individuals. Three clustering methods were used for grouping accessions and cultivars: unrooted neighbor joining (NJ), arithmetic average of unweighted pair-group method, (UPGMA) and principal coordinate analysis (PCA). All analyses were performed using the software DARwin version 5.0.157 (Perrier and Jacquemoud-Collet [Internet]). Groups obtained were compared to clusters generated by STRUCTURE.

Significance of population genetic structure was tested by Analysis of Molecular Variance (AMOVA) with ARLEQUIN version 3.1 software (Excoffier et al. 2005).

Geographic distribution

Available geographic coordinates of collection sites of accessions were retrieved from the Forages Database from CIAT (<http://isa.ciat.cgiar.org/urg/main.do?language=en>, accessed on Apr-01-2009). The Geographic Distance Matrix Generator software (Ersts [Internet]) was used to construct a matrix of linear distances (meters) between pairs of genotypes. Correlation between this matrix and the genetic dissimilarity matrix (obtained with microsatellites) was tested in the

software DARwin version 5.0.157. The geographic distribution of accessions was visualized with the DIVA-GIS program version 5.2.0.2 (Hijmans et al. 2001).

Analysis of genetic diversity using morphological descriptors

As a preliminary step, data from 24 morphological traits from Assis et al. (2003, 2001) was used for estimating the genetic diversity. These data have been previously obtained and analyzed by this author, who conducted an Anderson's discriminant analysis in six species of *Brachiaria* (a total of 301 accessions). These traits correspond to 6 vegetative traits: plant height (ALT), plant growth habit (HAB), leaf length (COF), leaf width (LAF), leaf growth habit (POF), length of leaf sheath (COB); 10 reproductive traits: length of floral stem (COH), inflorescence length (COI), number of racemes (NUR), length of basal raceme (COR), number of spikelets on basal raceme (NUES), spikelet insertion (IES), rachis width (LR), spikelet spot percentage (MES), stigma color (CEST), anther color (CANT); and 8 pubescence traits: density of rachis pubescence (PRADE), length of rachis pubescence (PRACO), density of leaf blade pubescence (PLD), length of leaf blade pubescence (PLC), margin of the leaf blade (BL), density of leaf sheath pubescence (PBD), length of leaf sheath pubescence (PBC), distribution of leaf sheath pubescence (PBU). A second round analysis was undertaken with the 10 traits with the higher Anderson's discriminant functions (Assis 2001): HAB, POF, IES, LR, CEST, CANT, PRADE, PRACO, BL and PBD.

Data from Assis et al. (2003, 2001) was obtained using 5 replicates per accession. Here, mean values of traits per accession were standardized by dividing each value by the standard deviation of the trait. The next step was to calculate pairwise matrices of Euclidean distances using the software NTSYSpc version 2.1 (Rohlf 1997).

For estimating the correlation between morphological distances and molecular similarities, a Jaccard's similarity matrix was constructed using molecular genotyping of those accessions morphologically evaluated. Correlations were calculated using the Mantel test (Mantel 1967) in NTSYSpc Version 2.1.

RESULTS

Microsatellites evaluation of *B. humidicola*

In this study, 27 microsatellites were genotyped in 58 accessions and two cultivars (Tupi, yet to be released, and COM) of *B. humidicola*. Accessions numbers and their respective mode of reproduction, chromosome information, ploidy levels and data about collection sites are shown in table 4.1.

Information about Polymorphism Information Content (PIC), number of alleles scored as bands and size range is displayed in table 3.1 of chapter 3. Transferability to *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura* and *B. ruziziensis* is also shown.

While scoring alleles into *B. humidicola*, we found that the maximum number of alleles scored simultaneously at a single locus (MNAS) were 4 (3 accessions), 5 (16 accessions and COM), 6 (19 accessions and Tupi), 7 (12 accessions), 8 (7 accessions) and 9 (1 accession) (table 4.1).

Amongst the 47 individuals for which ploidy levels were determined by chromosome counts (Pagliarini & Boldrini, unpublished data) 27 presented MNAS expected by ploidy levels (e.g. up to 6 alleles at a locus if the genotype behaviors as a hexaploid during metaphase, by forming hexavalents at the metaphases plate). In contrast, 20 individuals showed MNAS higher than the expected (table 4.1).

two different extractions were used, indicating that these loci may be absent in this genotype, which is the sole sexual amongst all individuals evaluated. In general, in the loci for which H031 amplified, a distinct banding pattern was observed, when compared to apomictic individuals. Figure 4.1 exemplifies these findings.

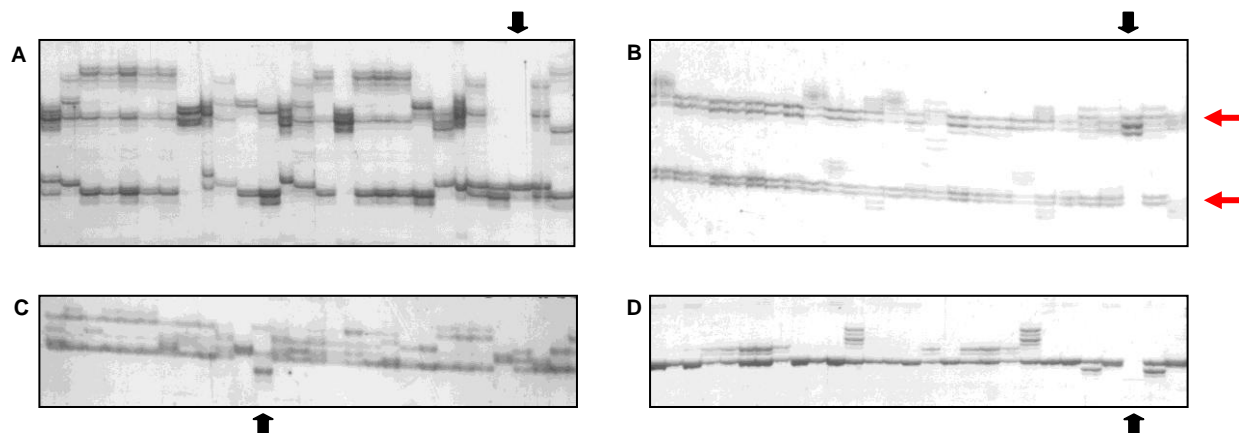


Figure 4.1. Allele profiling of accessions of *B. humidicola* with the loci BhUNICAMP005 (A), BhUNICAMP003 (B), BhUNICAMP018 (C), and BhUNICAMP008 (D). Amplification of two different regions of the genome (A and B) is indicated by red horizontal arrows. Although not all individuals are represented in the images, this pattern was observed in all genotypes, except for H029 and H031 in locus BhUNICAMP005 and H031 in locus BhUNICAMP003. The distinct allele profiling of H031 in indicated by black vertical arrows (A, B, C and D). Locus BhUNICAMP008 in an example of locus for which H031 did not amplify.

Population structure inferred by microsatellites

As a preliminary step for determining population subdivision, the Bayesian approach implemented by the software STRUCTURE clustered and allocated genotypes to the formed K clusters, by calculating individuals likely membership coefficients. For this analysis, a model is assumed in which there are K populations (where K may be unknown), each one being characterized by a set of allele frequencies at each locus. Individuals in the sample are assigned (probabilistically) into populations (clusters), or jointly to two or more populations if their genotypes indicate that they are admixed.

For each of the four analyses conducted (no-admixture/allele frequencies correlated; no-admixture/allele frequencies independent; admixture/allele frequencies correlated; admixture/allele frequencies independent) K_{SD} and ΔK resulted in different best K number of clusters, but $K = 8$ presented a high likelihood value (when not the highest) in all surveys. Nevertheless, membership coefficients for assigning individuals into clusters, that correspond to their respective inferred ancestry, were very similar for every K values over the four models tested, resulting in analogous clustering and assignment patterns in a given K. For that reason, results obtained for admixture models and allele frequencies correlated, with $K = 8$ was assumed.

Figure 4.2 shows clustering pattern for $K=8$. The graphic indicates the formation of 4 major clusters of distinct allele frequencies over all accessions, identified with numbers 1 (red), 2 (green), 3 (yellow) and 4 (orange). Number 5 indicates the sexual accession H031 characterized by an admixture of allele frequencies of clusters 1 (red), 2 (green) and 4 (orange) and the other four minor clusters formed (dark blue, light blue, magenta and purple). Cluster 2 (green) presented the lowest number of admixed individuals (12) and cluster 1 (red) happened to be the cluster with higher number of individuals (31 in total), and also the one to present the higher number of admixed individuals (20), including individuals that share alleles with H031 (H002, H016, H022, H026, H028, H030, H037, H038, H039, H040, H047, H121 and Tupi). In figure 4.3, allele pools present in genotypes is shown in another graphic display, ordered by current individuals numbers (1 to 60, according to table 4.1).

Clusters formed were compared to the biaxial plotting generated by PCA (figure 4.4) and to branches obtained in NJ (figure 4.5) and UPGMA (figure 4.6) trees.

Dissimilarity using the tree different grouping methods (PCA, UPGMA and NJ) resulted in groups similar to clusters generated by STRUCTURE, as indicated by the colors in trees and the biaxial plot obtained with PCA. The sexual accession H031, black colored in figures 4.4, 4.5 and 4.6, didn't group with any other accession in the UPGMA dendrogram and the NJ tree. Cultivars Tupi and COM were allocated in different clusters, and presented distinct allele frequencies background. Tupi was assigned into cluster 1 (red), while COM was placed in cluster 3 (yellow).

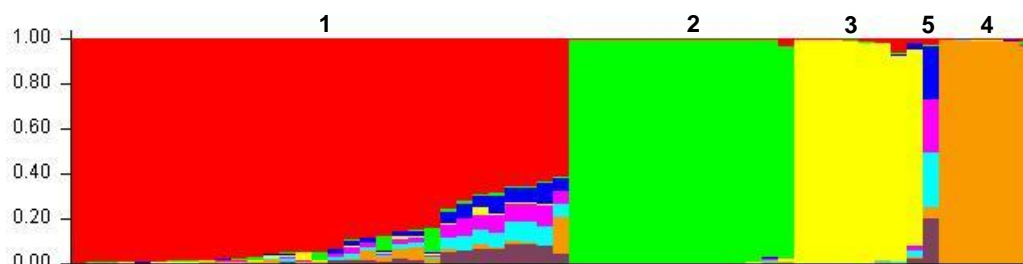


Figure 4.2. Analysis performed on STRUCTURE 2.2 using a no-admixture model with correlated allele frequencies. The clustering profile obtained for $K = 8$ is displayed. Each vertical bar corresponds to one of the 60 genotypes analyzed, ordered according to formed clusters, which are indicated by colors. Bars with two or more colors simultaneously represent individuals from a given cluster that share alleles with other gene pools and is assorted into two or more clusters simultaneously if their genotypes indicate that they are admixed. The four major clusters formed is indicated by the numbers 1, 2, 3 and 4. The sexual accession H031 is indicated by the number 5.

Coefficients of dissimilarity for the 58 accessions and the two cultivars ranged from 0.022 to 0.88, with an average value of 0.59. About 70% of dissimilarity coefficients were equal to 0.66 ± 0.05 . Both in the NJ tree and the UPGMA phenogram, branches were supported by high bootstrap frequencies and main ramifications in groups 2, 3 and 4 presented bootstrap values equal to 100. In the genetic diversity revealed by dissimilarity using the UPGMA method, the phenogram showed a cophenetic correlation of 0.9865, indicating that there was little distortion between the phenogram and its original dissimilarity matrix.

The analyses of molecular variance evidenced highly significant ($P < 0.001$) differentiation among clusters 1, 2, 3, 4 and the isolated sexual H031, indicating that about 44% of the variation found can be explained by germplasm subdivision in these 5 groups.

Geographical origin in relation to population structure

In order to evaluate if population structure is a consequence of the distribution of the sites of origin of accessions over the African continent, the correlation between the geographic distance matrix and the genetic similarity matrix (calculated for accessions with known geographic coordinates of collection sites) was estimated. The Mantel test resulted in $r = 0.01887$, revealing no significant associations between genetic and geographic variation. A graphical representation of this result is found in figure 4.6, in which each accession in the UPGMA dendrogram is linked to its proper sites of collections. In general, only the group shown in green in the dendrogram (equivalent to cluster 2 of STRUCTURE's analysis) corresponded to

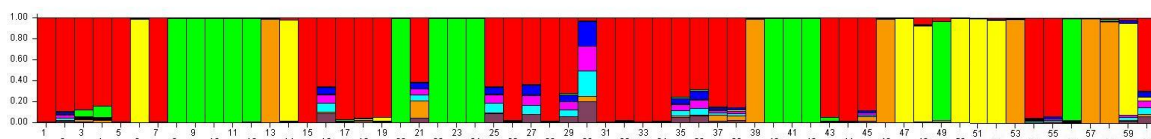


Figure 4.3. Another view of clusters generated by STRUCTURE 2.2. Accessions (1 to 58) and the 2 commercial cultivars (59 and 60) are displayed in current numbers. Membership coefficients (left side scale) used to allocate individuals into $K = 8$ clusters (same as figure 4.2) is indicated. Identification of genotypes is given below the bars and corresponds to AN (annotated numbers, table 4.1). Bar 30 represents H031, the sole sexual accession. As indicated by the colors of the bars, although H031 presents very distinct gene pools (dark blue, magenta, light blue, orange and purple) when compared to most genotypes, it shares these pools with 2 (H002), 16 (H016), 21 (H022), 25 (H026), 27 (H028), 29 (H030), 35 (H037), 36 (H038), 37 (H039), 38 (H040), 45 (H047), 55 (H121) and 60 (Tupi).

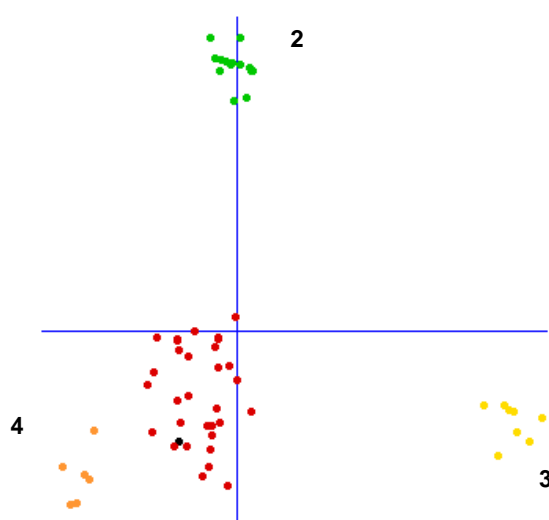


Figure 4.4. Principal coordinate analysis of microsatellite diversity based on the presence/absence of alleles. Colors represent populations identified at $K = 8$ in figure 4.2. Black spot represents the sexual accession indicated in table 4.1 (H031).

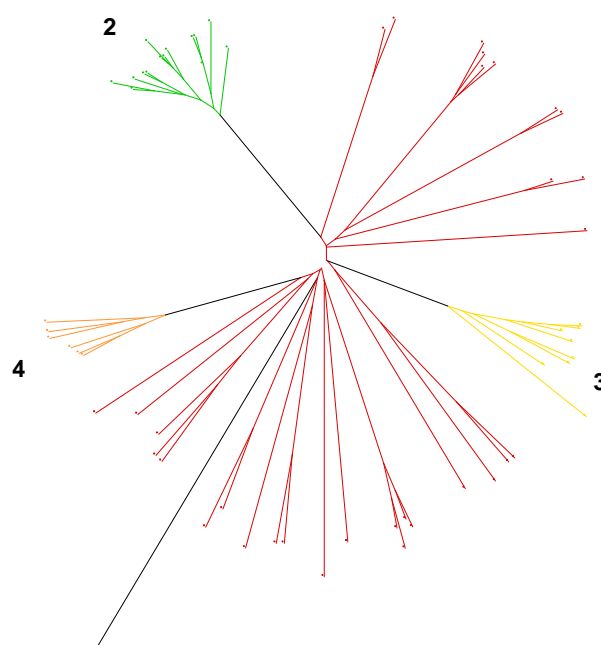


Figure 4.5. Unrooted neighbor joining tree of the 58 accessions and the commercial cultivars. Colors of branches correspond to colors of STRUCTURE clusters of figure 4.2, except for the black colored branch, which represents the sexual accession H031.

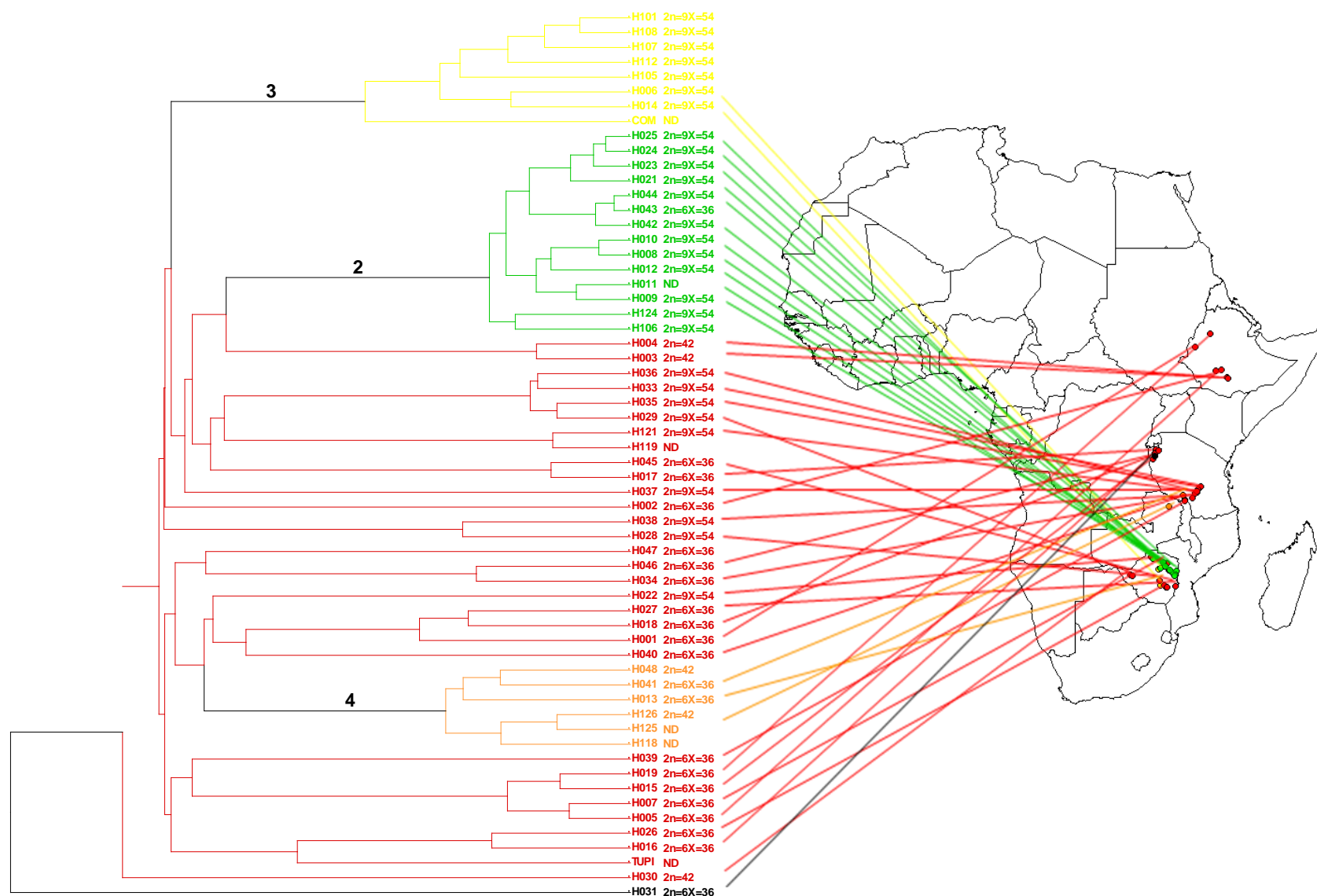


Figure 4.6. UPGMA tree showing accessions and cultivars grouped by Jaccard's similarity. Colors and numbers are the same of STRUCTURE's clusters (figure 4.2), except for sexual accession H031 (displayed in black). Chromosome counts and ploidy levels (table 4.1) are indicated. Accessions with geographic coordinates available in the Forages Databases at CIAT are linked to collection sites, spotted into the African continent map using the program DIVA-GIS 5.2.0.2. For reference, names of Countries are found in table 4.1.

Table 4.2. Analysis of Molecular Variance conducted for the four major groups of individuals and the sexual accession H031

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	P
Among clusters	4	589.416	13.37808 Va	44.32	0.00000
Within clusters	55	924.334	16.80608 Vb	55.68	
Total	59	1513.750	30.18416		

individuals of the same locality. The number of samples of the yellow group (cluster 3 of STRUCTURE) with known geographic coordinates was too small to infer any trend. In contrast, the orange group (cluster 4 of STRUCTURE) presented three accessions with clear distinct origins. Accessions shown in red (cluster 1 of STRUCTURE) were sparsely spread throughout four countries, from Zimbabwe, to the south, to Ethiopia in the north.

Comparison of genetic diversity revealed by morphological descriptors and molecular markers

In the first round analysis, correlation between the matrix of molecular dissimilarities and the matrix of Euclidean distances calculated with 24 morphological descriptors was tested and showed to be very low ($r = 0.04$). When the matrix of Euclidean distances generated only with the 10 traits with the higher Anderson's discriminant functions (Assis 2001) was tested, correlation was a little higher ($r = 0.21$), but still very low do be considered as a good fit value.

DISCUSSION

The germplasm collection of *B. humidicola* held at Embrapa represents a challenge to the breeding program. Although this species is alogamous, it also presents apospory, one of the three types of apomixis (Nogler 1984). Apomixis is facultative in most genotypes and a meiotically derived sac may be present along with an aposporous sac in the same ovule or in different ovules of the same plant. Precocious development of aposporous sacs (Lutts et al. 1994; Dusi and Williamse 1999) results in apomictic reproduction predominating, even when a high percentage of

ovules had a meiotically derived sac (Savidan 2000). From a total of 58 wild accessions preserved in the germplasm collection, only one reproduces by sexual means, while, in the others, apomixis prevails (Valle 1990). As a result, only accession H031, the sexual one, can be used as a female genitor, which limits considerably the possibilities of crosses. When hybrids are produced, however, half of the progeny should reproduce sexually, increasing considerably the opportunities to select superior female genitors for the next cycle of crosses.

Furthermore, variation in ploidy also represents an obstacle. Ferguson and Crowder (1974) showed the limitations imposed for interploid crosses in *Brachiaria*. In a practical approach, crosses between individuals with different chromosome numbers and/or distinct meiotic behaviors usually result in progeny infertility. In *B. humidicola*, only the sexual accession H031, which is a hexaploid presenting 36 chromosomes, can be crossed to the other 20 accessions with the same cytogenetic profile (table 4.1).

While this germplasm collection was established in the middle 1980's, apomictic reproduction and the little knowledge about ploidy differences delayed initiation of breeding. This activity is quite recent and became possible only after completion of basic studies attempting to cytogenetically characterize and determine mode of reproduction of accessions. Cultivars of *B. humidicola* available are products of direct selection of agronomically elite genotypes amongst the existing natural variability. Thus, the possibility of generating novel variation through artificial crosses should bring about new perspectives for this species.

Assessment of the genetic diversity at the molecular level has arisen as a powerful tool for guiding crosses in the breeding program. A first survey was carried out by Chiari et al. (2007), who used RAPD markers to perform a characterization of this germplasm collection.

In this study, microsatellites analysis allowed the differentiation and assessment of the genetic variability of 58 accessions and two cultivars of *B. humidicola* from the Brazilian germplasm collection held at EBC. The population structure identified by different statistical approaches is consistent with the expectation that sexual accessions in species presenting facultative apomixis should not cluster together with apomictics. The same results were previously found for *Paspalum notatum* with RAPD (Daurelio et al. 2004) and AFLP (Espinoza et al. 2006) markers. As revealed by the analysis conducted on STRUCTURE, the sexual accession (H031) did not join the main clusters formed. In the contrary, it revealed itself as an admixture of different clusters, presenting distinct allele pools not shared with most of the accessions. From all individuals that shared these gene pools with H031, only H016 was collected in the same country (Burundi) and their collection sites were about 39 kilometers apart. All the others were collected in locations at least 700 km away from H031.

The same clustering pattern observed in the Bayesian analysis was obtained for groups generated from molecular similarity. In general, three strongly supported groups were formed,

and smaller similarities resulted in individuals placed in the less defined group. The sexual accession H031, once more, did not group with any other (although in PCA analysis, it depended of axes used to create plots; data not shown).

These results reflect the amplification profiling of microsatellite in the analyzed material. Among the 27 loci evaluated, H031 presented a pattern of amplification different from all the other genotypes in 8 loci. We were able to identify 5 alleles present exclusively in this sexual accession. In contrast, out of the 326 alleles scored across all loci, 276 were absent in H031. Similar data was also evidenced by Chiari et al (2007) with RAPD markers, when these authors evidenced bands absent in H031 and present in apomictics accessions.

Although only one sexual genotype was sampled and no information about genome coverage in *B. humidicola* with these loci is available at the moment, these preliminary findings indicate that apomixis must have blocked recombination in this species. Further research in a segregating population obtained from sexual x apomictic crosses of hexaploid *B. humidicola* is underway to establish the relation of these loci with apomixis. For an immediate application into the breeding program, the loci with alleles found in apomictic accessions, but not the sexual one, represent a powerful tool for early identification of interspecific hybrids, representing time and cost economy, since it can avoid further evaluation for determining the mode of reproduction in progenies.

In order to better explore the variability found in the germplasm, we suggest that controlled crosses using H031 as the female parent should focus on accessions belonging to the clusters/groups 2 and 4 (respectively green and yellow in figures 4.2, 4.4, 4.5 and 4.6). Considering the ploidy of the material, only accession H043 (group 2) could be used for this purpose in a direct approach as a pollen donor. Exploration of diversity using the nonaploid accessions that belong to cluster/group 2 and all accessions allocated in cluster/group 4 depends now on the suggestion of a new breeding scheme to bypass ploidy differences. Crossing between accessions belonging to the cluster/group 1 (show in red in figures 4.2, 4.4, 4.5 and 4.6) will result in higher genetic gain if focused in genotypes that do not share allelic pools with H031. Cultivars Tupi and COM were allocated in distinct clusters/groups and appear to have diverse genetic backgrounds when compared to each other. Since both are apomictic, their chromosome counting and evaluation of metaphasic behavior would help in determining if these genotypes are cytogenetically compatible for being crossed with H031. In a positive case, agronomically interesting traits present in these cultivars could possibly be joined if each of them could be independently crossed with H031 and their respective sexual descendents could subsequently be intercrossed in a second round.

In the UPGMA phenogram, within the strongly supported groups 2 and 3, individuals with 54 chromosomes separated from individuals with 36. An exception is found in group 2, in which

the accession H043, with 36 chromosomes, was placed amongst accessions with 54 chromosomes. So, a slight tendency evidenced that different ploidy levels (6X and 9X) were assorted in separate groups. It's was also possible to evidence that the accession H030 (2n=42) formed an out group in relation to all the others. Accessions H003 and H004 (also with 42 chromosomes) formed a group related to group 2 (in which prevails 54 chromosomes) and accessions H048 and H126 (2n=42) grouped with accessions that present 36 chromosomes. Cytogenetical analyses realized in the 5 accessions with 42 chromosomes have previously indicated a genome elimination during metaphases (Pagliarini, personal communication). The grouping pattern observed in this genetic study confirms the expectation that genome elimination may have been responsible for the evolution of the species and indicates that genotypes with 42 chromosomes probably form the basic background to the species evolution. We expect molecular cytogenetic analyses to give a more profound interpretation of this evidence in the near future.

Our data suggest that there is no correlation between genetic dissimilarity and geographic distance among the accessions of *B. humidicola*. These results are in agreement with previous works on *Paspalum notatum* (Daurelio et al. 2004; Espinoza et al. 2006), another grass species presenting variable ploidy levels and apomixis. The low level of genetic structure among *B. humidicola* accessions of distinct origins and with different chromosome numbers suggests that apomixis may have buffered the genetic status of the species, providing an exceptional fitness for a wide range of environments and preventing the homogenization of genome during evolution (Lacape et al. 2007)

In a last content, the fact that variation in morphological descriptors did not correlate with molecular relationships indicated that the analyzed traits probably are subjected to high environmental effects, as usually seen in complex traits such as the ones involved in the analyses. We believe that a further evaluation of their inheritance would reveal all these descriptors being classified as polygenic traits with low heritability.

REFERENCES

- Assis GML (2001) Análise discriminante e divergência genética em espécies de *Brachiaria*. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa.
- Assis GML, Euclides RF, Cruz CD, do Valle CB (2003) *Brachiaria* species discrimination based on different groups of morphological traits. Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science 32(3):576-584
- Catasús Guerra L (2001) De Poaceis Cubensibus Notulae, III (In: Floram Novam Cubensem Stvdia Intendentia). Fontqueria 55(4): 15-17

- Chiari L, Salgado LR, Valle CB do, Jungmann L, Valle JVR, Leguizamon GCO (2007) Estimativa da variabilidade genética em acessos de *Brachiaria humidicola* utilizando marcadores RAPD. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento no. 1. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande
- Daurelio LD, Espinoza F, Quarin CL, Pessino SC (2004) Genetic diversity in sexual diploid and apomictic tetraploid populations of *Paspalum notatum* situated in sympatry or allopatry. Plant Systematics and Evolution 244(3-4): 189-199.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19:11–15
- Dusi DMA, Williamse MTM (1999) Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf: gametophytic development and reproductive calendar. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 41:151-162
- Espinoza F, Daurelio LD, Pessino SC, Valle EM, Quarin CL (2006) Genetic characterization of *Paspalum notatum* accessions by AFLP markers. Plant Systematics and Evolution 258(3-4): 147-159.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular Ecology 14(8): 2611-20.
- Ersts PJ [Internet] Geographic Distance Matrix Generator (version 1.2.3). American Museum of Natural History, Center for Biodiversity and Conservation. Available from http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg. Accessed on Apr-01-2009
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1:47-50
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. Genetics 164(4): 1567-87.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. Molecular Ecology Notes 7(4): 574-578.
- Ferguson JE, Crowder LV (1974) Cytology and breeding behavior of *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard. Crop Science 14(6): 893-895.
- Gonzalez AMT, Morton CM (2005) Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urochloa* (Poaceae). Molecular Phylogenetics and Evolution 37(1): 36-44.
- Grisebach A (1853) Gramineae. In: Ledebour CF (ed.) Flora Rossica, vol 4. Sumptibus Librariae E. Schweizerbart, Stuttgart, pp 324-484
- Hijmans RJ, Guarino L, Cruz M, Rojas E (2001) Computer tools for spatial analysis of plant genetic resources data: 1. DIVA-GIS. Plant Genetic Resources Newsletter 127:15-19. Available from (<http://www.diva-gis.org/>). Accessed on Apr-01-2009

- Lacape JM, Dessauw D, Rajab M, Noyer JL, Hau B (2007) Microsatellite diversity in tetraploid *Gossypium* germplasm: assembling a highly informative genotyping set of cotton SSRs. *Molecular Breeding* 19(1):45-58
- Lutts S, Ndikumana J, Louant B-P (1994) Male and female sporogenesis and gametogenesis in apomictic *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* and F₁ hybrids with sexual colchicine induced tetraploid *B. ruziziensis*. *Euphytica* 57:267-274
- Mantel NA (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27:209-220.
- Miles JW, Valle CB do, Rao IM, Euclides VP (2004) Brachiariagrasses. In: Al-Amoodi LK, Moser LE, Burson BL, Sollenberger LE (eds.) Warm-Season (C4) Grasses, Agronomy Monograph no. 45. American Society of Agronomy, Madison, pp. 745-783
- Morrone O, Zuloaga FO (1992) Revisión de las Especies Sudamericanas Nativas e Introducidas de los Géneros *Brachiaria* y *Urochloa* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). *Darwiniana* 31:43-109
- Nybom H (1994) DNA fingerprinting - a useful tool in fruit breeding. *Euphytica* 77: 59-64
- Nogler GA (1984) Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus-Auricomus*. 5. Conclusion. *Botanica Helvetica* 94(2): 411-422.
- Perrier X, Jacquemoud-Collet JP [Internet] DARwin: Dissimilarity Analysis and Representation for Windows (version 5.0.157). Genetica improvement of vegetatively propagated crops, CIRAD. Available from <http://darwin.cirad.fr/darwin>. Accessed on Apr-01-2009
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(2): 945-59.
- Renvoize SA, Clayton WD, Habuye CHS (1996) Morphology, taxonomy, and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb.. In: Miles JW, Maass BL, Valle CB do (eds.) *Brachiaria: Biology, Agronomy and Improvement*. Embrapa/CIAT, Cali, pp. 1-15
- Rohlf FJ (1997) NTSYS-PC: numerical taxonomy and multivariate analyses systems. Exeter Software, New York
- Savidan YH (2000) Apomixis: genetics and breeding. *Plant Breeding Reviews* 18:13-86
- Trinius CB (1834) Panicearum genera retractavit speciebusque compluribus illustravit. The copy in the smithsonian libraries, dated June 1834 in pencil, is paginated from 1 through 267, and the title page indicates neither city nor publisher. It is a preprint of the paper with the same title in the following: 1835, *Memoires de l'Academie Imperiale des Sciences de Saint-Petersbourg*, sixth series (Sciences Naturelles), 1: 89-355

- Valle CB do (1990) Coleção de germoplasma de espécies de *Brachiaria* no CIAT: estudos básicos visando ao melhoramento genético. Documentos no. 46. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande
- Veldkamp JF (1996) *Brachiaria*, *Urochloa* (Gramineae---Paniceae) in Malesia. *Blumea* 41(2): 413-437
- Zhang L-H, Ozias-Akins P, Kochert G, Kresovich S, Dean R, HannaW (1999) Differentiation of Bermudagrass (*Cynodon* spp.) genotypes by AFLP analyses. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 895-902
- Zuloaga FO, Morrone O (2003) *Urochloa*. In: Catalogue of New World Grasses (Poaceae): III. Subfamilies Panicoideae, Aristidoideae, Arundinoideae, and Danthonioideae. Contributions from the United States National Herbarium 46: 629-634

DISCUSSÃO GERAL

Brachiaria é um gênero cosmopolita, representado por cerca de 100 espécies, das quais sete despertaram particular interesse nas últimas cinco décadas devido ao seu potencial forrageiro: *B. arrecta*, *B. mutica*, *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis*. Por essa razão, um intenso trabalho de coleta e intercâmbio de germoplasma de espécies africanas de *Brachiaria* foi realizado na década de 1980 visando a sua introdução, especialmente, na América tropical (Keller-Grein et al. 1996). Uma destas coleções foi importada pela Embrapa e tem sido submetida a avaliações citológicas, agrônômicas e morfológicas, bem como tem sido explorada em um programa de melhoramento genético.

Devido à reconhecida utilidade de marcadores moleculares em programas de melhoramento de espécies vegetais, nas últimas duas décadas, a Embrapa, através da Embrapa Gado de Corte, tem investido na implantação de estrutura física e na formação de recursos humanos visando ao estabelecimento de um programa genético-molecular que suporte o seu Programa de Melhoramento de Forrageiras Tropicais. Dada à inexistência de marcadores específicos para espécies de *Brachiaria*, os primeiros trabalhos realizados neste sentido relatam a utilização de marcadores multi-locos do tipo RAPD na caracterização genética molecular de um pequeno número de acessos promissores e de cultivares de *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis* (Chiari et al. 2008; Bonatto et al. 2002). Além disso, uma avaliação mais extensiva envolvendo todos os acessos conservados de *B. humidicola* foi realizada por Chiari et al. (2007). Marcadores RAPD foram também usados na identificação precoce de híbridos intraespecíficos de *B. humidicola* (Bitencourt et al. 2008). As primeiras tentativas de se utilizar marcadores loco específicos em *Brachiaria* foram realizadas por Arruda et al. (2007), que avaliaram a transferibilidade de microssatélites de milho, trigo e arroz para quatro espécies de *Brachiaria* e para *Panicum maximum*. Foi possível a utilização de primers heterólogos, originalmente desenvolvidos para *Z. mays*; *T. aestivum* e *O. sativa*, para amplificação de microssatélites em diferentes espécies de *Brachiaria* e em *P. maximum*. Entretanto, devido ao baixo polimorfismo evidenciado, estes marcadores não foram usados em avaliações subsequentes de *Brachiaria*.

O trabalho de desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Brachiaria* spp. apresentado nesta tese foi iniciado em 2004, a partir da construção de bibliotecas genômicas, enriquecidas em sequências repetitivas, para *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis*. Uma vez construídas as bibliotecas, foram sequenciados um total de 384 clones isolados e, das sequências obtidas, foram desenhados um total de 65 pares de primers para cada espécie. Até o presente momento, foram testados primers desenhados para *B. brizantha* e *B. humidicola*, razão pela qual somente os microssatélites desenvolvidos para estas duas espécies são apresentados.

Neste manuscrito, são realizados os primeiros relatos do isolamento de microssatélites para *B. brizantha* (capítulos 1 e 2) e *B. humidicola* (capítulo 3). Esta também é a primeira vez que marcadores moleculares desta natureza são descritos para o gênero *Brachiaria*. Microssatélites polimórficos foram identificados e mostraram-se eficazes para acessar a variabilidade natural existente em espécies de interesse agrônômico preservadas no banco de germoplasma brasileiro de *Brachiaria* spp. (capítulos 2 e 4).

Tanto em *B. brizantha* como em *B. humidicola*, a estruturação da diversidade genética molecular intraespecífica mostrou-se consistente quando acessada por diferentes métodos de análise (NJ, UPGMA, PCA e Bayesiana). A aplicação destas diferentes metodologias revelou uma complementaridade dos resultados encontrados: a metodologia Bayesiana de análise aplicada pelo programa STRUCTURE foi capaz de revelar aspectos da variação genética não evidenciados pelas análises baseadas em similaridade (NJ, UPGMA e PCA).

A comparação entre as topologias dos dendrogramas mostrados nas figuras 2.2 (*B. brizantha*) e 4.6 (*B. humidicola*) permite observar em *B. humidicola* a formação de três grupos altamente definidos (mostrados em verde, amarelo e laranja, facilmente identificados também nas figuras 4.4 e 4.5), enquanto que, em *B. brizantha* a conformação do fenograma mostra que a variação genética não se configura com a mesma resolução. Estas evidências sugerem que a variação genética está mais bem estruturada dentro de *B. humidicola* do que dentro de *B. brizantha*.

Em *B. humidicola*, o acesso sexual H031 apresentou um background genético particularmente distinto dos acessos apomíticos, revelado tanto pela observação dos géis de acrilamida, como pelas análises estatísticas realizadas. Nesta espécie, foi possível evidenciar cinco alelos exclusivos ao acesso sexual. Por outro lado, cerca de 85% (276 em um total de 326) dos alelos foram encontrados somente nos genótipos apomíticos. Como consequência, as análises estatísticas mostraram o acesso H031 como um grupo isolado em relação aos demais acessos, apomíticos. A análise Bayesiana realizada com o programa STRUCTURE, que define a formação de clusters com base em *pools* de frequências alélicas, mostrou que o genótipo sexual compartilha alelos somente com 13 apomíticos e que, todavia, mesmo sendo constatado este compartilhamento, apenas uma fração inferior a 50% do genoma apomítico é comum ao sexual. Estes resultados sugerem que os microssatélites que geram marcas exclusivas aos apomíticos devem ser analisados com especial atenção em estudos de mapeamento em populações de *B. humidicola* segregantes para a apomixia. Igualmente, estes recursos podem ser aproveitados imediatamente pelo Programa de Melhoramento de Forrageiras Tropicais da Embrapa na seleção precoce assistida de híbridos de natureza interespecífica.

Resultados contrastantes foram encontrados em *B. brizantha*. A observação dos géis de acrilamida mostrou que o único acesso sexual (B105) apresentou, ao longo dos 20 *loci*

utilizados na caracterização desta espécie, um perfil alélico similar ao encontrado nos apomíticos. Do mesmo modo, as análises estatísticas realizadas não identificaram B105 como um grupo isolado dos demais genótipos.

A transferibilidade dos locos isolados de *B. brizantha* e *B. humidicola* foi verificada entre estas duas espécies e também em *B. decumbens*, *B. dictyoneura* e *B. ruziziensis*. Primers originários de ambas as espécies puderam ser transferidos entre os taxa avaliados. Sete microssatélites de *B. brizantha* puderam ser utilizados na caracterização da diversidade interespecífica destas cinco espécies combinadas. Os resultados obtidos concordam com a caracterização prévia desta coleção de germoplasma realizada por Assis (2001), utilizando marcadores morfológicos, de que *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis* são as espécies mais próximas entre si dentre as cinco estudadas. *B. dictyoneura* e *B. humidicola* também se revelaram mais próximas em relação uma à outra do que em relação às três demais espécies. Estes resultados sugerem que a diversidade genética molecular envolvendo estes cinco taxa está estruturada de acordo com os complexos agênicos descritos em *Brachiaria* por Valle & Savidan (1996).

A caracterização de cultivares de *Brachiaria* juntamente com acessos do banco de germoplasma permitiu quantificar a divergência genética destas cultivares em relação aos acessos que as originaram. Embora as cultivares Aparoti e Marandu tenham apresentado dissimilaridades relativamente altas em relação a suas respectivas origens (0,21 e 0,30; B163 e B030, respectivamente), conforme esperado, estes acessos foram os mais próximos destas cultivares dentre todos os avaliados. A dissimilaridade observada deve ser considerada alta para uma espécie de reprodução clonal, em que a expectativa seria de algo o mais próximo possível de zero. Entretanto, conforme mencionado na "Introdução" deste manuscrito, a alta probabilidade de ocorrência de contaminações do material mantido no campo (de onde as amostras foliares foram extraídas para subsequente realização de extração de DNA) pode, possivelmente, ser a causa destes resultados. Todavia, as cultivares em questão mostraram-se mais próximas dos respectivos acessos originais do que de todos os outros (figura 2.2), o que, aleatoriamente, seria improvável como decorrência de contaminação. Ainda assim, estes resultados sugerem que novas avaliações devem ser efetuadas utilizando-se sementes genéticas, tanto das cultivares como dos acessos, como uma fonte mais segura para extração de DNA.

Os resultados apresentados indicam que uma valiosa caracterização foi realizada no germoplasma de *Brachiaria* conservado no Brasil. A importância desse trabalho é especialmente justificada pelo fato de este se tratar de um dos maiores germoplasmas de braquiária preservados atualmente; também porque o estudo realizado envolve as cinco espécies de maior valor econômico e de maior interesse agrônomo para a pecuária bovina na América tropical.

Extensões dos resultados obtidos através da adição de informações de natureza citogenética, e aquelas obtidas por avaliações morfológicas e agronômicas realizadas em acessos de *B. brizantha* virão a contribuir para enriquecer a discussão realizada sobre esta espécie. Além disso, a continuidade no desenvolvimento de novos microssatélites para *Brachiaria*, a partir das bibliotecas genômicas já construídas, será de extrema valia para a realização de novos estudos genéticos neste material.

CONCLUSÕES GERAIS

- 1) Foram desenvolvidos marcadores microssatélites polimórficos para *B. brizantha* e *B. humidicola*, constituindo o primeiro conjunto de marcadores de natureza loco-específica para *Brachiaria*. Estes marcadores foram eficazes em acessar a diversidade genética molecular no germoplasma brasileiro de cinco espécies deste gênero: *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis*
- 2) As análises de diversidade interespecífica indicaram que *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis* são as espécies mais próximas dentre as cinco espécies estudadas. Por outro lado, *B. dictyoneura* e *B. humidicola* mostraram-se mais próximas uma da outra do que das demais. Estes dados corroboram dados disponíveis na literatura que apontam *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis* como um complexo agâmico e *B. dictyoneura* e *B. humidicola* como outro
- 3) O único acesso sexual de *B. humidicola* (H031) preservado nesta coleção de germoplasma apresentou um perfil alélico totalmente distinto dos demais acessos pertencentes a esta espécie, ao longo de todos os locos avaliados. Foi possível identificar cinco marcas, em oito microssatélites, exclusivas em H031. Foram identificadas ainda 276 marcas (em um total de 326 geradas para os 27 locos estudados) ausentes no genótipo sexual e, consequentemente, presentes nos apomíticos
- 4) Em *B. brizantha*, o único acesso sexual disponível nesta coleção de germoplasma mostrou um perfil alélico similar ao encontrado nos apomíticos
- 5) Em *B. humidicola*, não foi possível estabelecer uma correlação entre a diversidade genética molecular e a diversidade genética revelada por marcadores morfológicos
- 6) Do mesmo modo, em *B. humidicola* não foi possível estabelecer uma correlação entre as dissimilaridades genéticas moleculares e as distâncias geográficas associadas aos locais de origem dos acessos avaliados

REFERÊNCIAS GERAIS

- Able JA, Langridge P, Milligan AS (2007) Capturing diversity in the cereals: many options but little promiscuity. *Trends in Plant Science* 12(2):71-79
- Adamowski E de V, Boldrini KR, Pagliarini MS, Valle CB do (2007) Abnormal cytokinesis in microsporogenesis of *Brachiaria humidicola* (Poaceae: Paniceae). *Genetics and Molecular Research* 6(3): 616-621
- Adamowski E de V, Pagliarini MS, Valle CB do (2008) Meiotic behaviour in three interspecific three-way hybrids between *Brachiaria ruziziensis* and *B. brizantha* (Poaceae : Paniceae). *Journal of Genetics* 87(1): 33-38
- Arruda A, Cançado LJ, Chiari L, Valle CB do, Jank L (2007) Avaliação da transferência de microssatélites de milho, trigo e arroz para quatro espécies de *Brachiaria* e para *Panicum maximum*. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* no. 21. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande
- Akkaya MS, Shoemaker RC, Specht JE, Bhagwat AA, Cregan PB (1995) Integration of simple sequence repeat DNA markers into a soybean linkage map. *Crop Science* 35(5):1439-1445
- Ambiel AC, Guaberto LM, Vanderlei TM, Neto NBM (2008) RAPD grouping of accesses and cultivars of three *Brachiaria* species. *Acta Scientiarum-Agronomy* 30(4): 457-464
- Araújo ACG, Nóbrega JM, Pozzobon MT, Carneiro VT (2005) Evidence of sexuality in induced tetraploids of *Brachiaria brizantha* (Poaceae). *Euphytica* 144:1-2
- Assis GML (2001) Análise discriminante e divergência genética em espécies de *Brachiaria*. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa.
- Assis GML de, Euclides RP, Cruz CD, Valle CB do (2003) Discriminação de Espécies de *Brachiaria* Baseada em Diferentes Grupos de Caracteres Morfológicos. *Revista Brasileira de Zootecnia* 32(3):576-584
- Baack EJ (2005) To succeed globally, disperse locally: effects of local pollen and seed dispersal on tetraploid establishment. *Heredity* 94(5) 538-546
- Bell CJ, Ecker JR (1994) Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* 19(1):137-144
- Bennett MD (2004) Perspectives on polyploidy in plants—ancient and neo. *Biological Journal of the Linnean Society* 82:411–423
- Bogdan AV (1977) Tropical pasture and fodder plants. Longman, New York

- Boldrini KR, Pagliarini MS, Valle CB do (2006a) Abnormal timing of cytokinesis in microsporogenesis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae: Paniceae). *Journal of Genetics* 85(3): 225-228
- Boldrini KR, Pagliarini MS, Valle CB do (2006b) Cell fusion and cytomixis during microsporogenesis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae). *South African Journal of Botany* 72(3): 478-481
- Bonato ALV, Valle CB do, Jank L, Penteado MIO, Leguizamon G (2002) Determinação da diversidade genética por meio de marcadores moleculares em acessos de *Brachiaria* spp.. In: Anais da XXXIX^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics* 32:314-331
- Bitencourt GA, Chiari L, Valle CB do, Salgado LR, Leguizamon GO (2008) Uso de Marcadores RAPD na Identificação de Híbridos de *Brachiaria humidicola*. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* no. 23. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande
- Chiari L, Salgado LR, Valle CB do, Jungmann L, Valle JV do, Leguizamon GOC (2007) Estimativa da variabilidade genética em acessos de *Brachiaria humidicola* utilizando marcadores RAPD. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* no. 22. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande
- Chiari L, Rocha M da, Valle CB do, Salgado LR (2008) Variabilidade genética em acessos e cultivares de quatro espécies de *Brachiaria* estimada por marcadores RAPD. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* no. 24. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande
- Clayton WD, Renvoize SA (1986) *Genera Graminum, Grasses of the World*. Kew Bull. Additional Series XIII, London, pp. 283-285.
- Collevatti RG, Grattapaglia D, Hay JD. (2001) Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Molecular Ecology* 10(2):349-356
- Cregan PB, Jarvik T, Bush AL, Shoemaker RC, Lark KG, Kahler AL, Kaya N, VanToai TT, Lohnes DG, Chung J, Specht JE (1999) An integrated genetic linkage map of the soybean genome. *Crop Science* 39(5):1464-1490
- Cruz R, Miles JW, Roca W, Ramírez H (1989) Apomixis y sexualidad em *Brachiaria*. 1. Estudios bioquímicos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 23(3): 301-305
- Davidse G (1993) Poaceae. In: Brako L, Zarucchi JL (eds.) *Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 45, 1258.

- Dayanandan S, Dole J, Bawa K, Kesseli R (1999) Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). *Molecular Ecology* 8(10):1585-1592
- Dusi DMA, Williamse MTM (1999) Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf: gametophytic development and reproductive calendar. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 41:151-162
- Ehrendorfer F (1980) Polyploidy and distribution. In: Lewis WH (ed.) *Polyploidy – Biological Relevance*, Plenum Press, New York, pp. 45–60
- Ferguson JE (1974) Method of reproduction in *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard. Tese de Doutorado. Cornell University, Ithaca (Dissertation abstracts AAT 7417101)
- Ferguson JE, Crowder LV (1974) Cytology and breeding behavior of *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard. *Crop Science* 14:893-895
- Ferreira ME, Grattapaglia D (1998) *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética* 3 ed. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília
- Felismino MF, Silva N, Pagliarini MS, Valle CB do (2008a) Mitotic behavior in root tips of *Brachiaria* genotypes with meiotic chromosome elimination during microsporogenesis. *Genetics and Molecular Research* 7(2): 336-341
- Felismino MF, Pagliarini MS, Valle CB do (2008b) A differential phenotypic expression of a divergent spindle mutation in interspecific *Brachiaria hybrids*. *Cell Biology International* 32(11): 1459-1463
- Fuzinato VA, Pagliarini MS, Valle CB do (2007a) Microsporogenesis in sexual *Brachiaria* hybrids (Poaceae). *Genetics and Molecular Research* 6(4): 1107-1117
- Fuzinato VA, Pagliarini MS, Valle CB do (2007b) Evidence of programmed cell death during microsporogenesis in an interspecific *Brachiaria* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae) hybrid. *Genetics and Molecular Research* 6(2): 308-315
- Fuzinato VA, Pagliarini MS, Valle CB do (2008) Evaluation of microsporogenesis in an interspecific *Brachiaria* hybrid (Poaceae) collected in distinct years. *Genetics and Molecular Research* 7(2): 424-432
- Gallo PH, Micheletti PL, Boldrini KR, Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Valle CB do (2007) 2n gamete formation in the genus *Brachiaria* (Poaceae: Paniceae). *Euphytica* 154(1-2): 255-260
- Gobbe J, Swenne A, Louant B-P (1981) Diplóides naturais et autotetraploides induits chez *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard: criteres d'indentification. *Agronomie Tropicale* 36:339-346

- Gonzalez AMT, Morton CM (2005) Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urochloa* (Poaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37(1): 36-44.
- Grisebach A (1853) Gramineae. In: Ledebour CF (ed.) *Flora Rossica*, vol 4. Sumptibus Librariae E. Schweizerbart, Stuttgart, pp 324-484
- Hacker JB (1988) Sexuality and hybridization in signal grass, *Brachiaria decumbens*. *Tropical Grasslands* 22(3):139-144
- Hopkinson JM, Souza FHD de, Diulgheroff S, Ortiz A, Sánchez M (1996) Reproductive physiology, seed production, and seed quality of *Brachiaria*. In: Miles JW, Maass BL, Valle CB do (eds.) *Brachiaria: biology, agronomy and improvement*. Embrapa/CIAT, Cali, pp 124-140
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2006) Censo Agropecuário. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Governo Brasileiro
- Jamnadass R, Mace ES, Hiernaux P, Muchugi A, Hanson J (2006) Population genetic responses of wild forage species to grazing along a rainfall gradient in the Sahel: A study combining phenotypic and molecular analyses. *Euphytica* 151(3):431-445
- Junqueira RG, Mendes-Bonato AB, Pagliarini MS, Bione NCP, Valle CB do, Penteado MIO (2003) Absence of microspore polarity, symmetric divisions and pollen cell fate in *Brachiaria decumbens* (Gramineae). *Genome* 46(1): 83-88
- Keller-Grein G, Maass BL, Hanson J (1996) Natural variation in *Brachiaria* and existing germplasm collections. In: Miles JW, Maass BL, Valle CB do (eds.) *Brachiaria: biology, agronomy and improvement*. Embrapa/CIAT, Cali, pp 16-42
- Landergott U, Naciri Y, Schneller JJ, Holderegger R (2006) Allelic configuration and polysomic inheritance of highly variable microsatellites in tetraploid gynodioecious *Thymus praecox* agg. *Theoretical and Applied Genetics* 113(3):453-465
- Lapointe SL, Miles JW (1992) Germplasm case study: *Brachiaria species*. In: *Pastures for the tropical lowlands: CIAT's contribution*. CIAT, Cali pp 43-55
- Leitch AR, Leitch IJ (2008) Perspective - Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. *Science* 320(5875):481-483
- Levin DA (1975) Minority cytotype exclusion in local plant populations. *Taxon* 24: 35-43
- Levin DA (1983) Polyploidy and novelty in flowering plants. *The American Naturalist* 122:1-25
- Letteriello G, Valle CB do, Christiane D, Penteado MI de O (1999) Citologia e modo de reprodução de acessos pentaploides de *Brachiaria brizantha*. In: *Anais da 36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*. Porto Alegre CD- Rom

- López-Ferrari AR, Espejo Serna A (2000) Nuevas combinaciones em monocotiledóneas exicanas III (Orchidaceae, Poaceae). *Acta Botánica Mexicana* 51:61-70
- Lutts S, Ndikumana J, Louant B-P (1994) Male and female sporogenesis and gametogenesis in apomictic *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* and F₁ hybrids with sexual colchicine induced tetraploid *B. ruziziensis*. *Euphytica* 57:267-274
- Macedo MCM (2006) Aspectos edáficos relacionados com a produção de *Brachiaria brizantha* cultivar Marandu. In: Barbosa RA (ed.) Morte de pastos de braquiárias. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, pp 35-36
- Mendes DV, Boldrini KR, Mendes-Bonato AB, Pagliarini MS, Valle CB do (2006) Cytological evidence of natural hybridization in *Brachiaria brizantha* Stapf (Gramineae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 150(4): 441-446
- Mendes-Bonato AB, Valle CB do, Pagliarini MS, Penteado MIO (2002a) Caracterização de Acessos de *Brachiaria brizantha* (Gramineae). *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* no. 15. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande
- Mendes-Bonato AB, Pagliarini MS, Forli F, Valle CB, Penteado MID (2002b) Chromosome numbers and microsporogenesis in *Brachiaria brizantha* (Gramineae). *Euphytica* 125(3):419-425
- Mendes-Bonato AB, Junqueira RG, Pagliarini MS, Valle CB do, Penteado MID (2002c) Unusual cytological patterns of microsporogenesis in *Brachiaria decumbens*: abnormalities in spindle and defective cytokinesis causing precocious cellularization. *Cell Biology International* 26(7): 641-646
- Mendes-Bonato AB, Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Valle CB do (2003) Normal microspore production after cell fusion in *Brachiaria jubata* (Gramineae). *Genetics and Molecular Biology* 26(4): 517-520
- Mendes-Bonato AB, Pagliarini MS, Valle CB do, Jank L (2004) Abnormal pollen mitoses (PM I and PM II) in an interspecific hybrid of *Brachiaria ruziziensis* and *Brachiaria decumbens* (Gramineae). *Journal of Genetics* 83(3): 279-283
- Mendes-Bonato AB, Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Valle CB do (2006a) Chromosome number and meiotic behaviour in *Brachiaria jubata* (Gramineae). *Journal of Genetics* 85(1): 83-87
- Mendes-Bonato AB, Pagliarini MS, Valle CB do (2006b) Abnormal spindle orientation during microsporogenesis in an interspecific *Brachiaria* (Gramineae) hybrid. *Genetics and Molecular Biology* 29(1): 122-125
- Mendes-Bonato AB, Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Valle CB do (2006c) Cytogenetic evidence for genome elimination during microsporogenesis in an interspecific hybrid between

- Brachiaria ruziziensis* and *B. brizantha* (Poaceae). Genetics and Molecular Biology 29(4): 711-714
- Mendes-Bonato AB, Pagliarini MS, Valle CB do (2007) Meiotic arrest compromises pollen fertility in an interspecific hybrid between *Brachiaria ruziziensis* x *Brachiaria decumbens* (Poaceae: Paniceae). Brazilian Archives of Biology and Technology 50(5): 831-837
- Miles JW, Maass BL, Maas BL, Valle CB do (1996) *Brachiaria*: biology, agronomy and improvement. Embrapa/CIAT, Cali
- Miles JW, Valle CB do, Rao IM, Euclides VP (2004) Brachiariagrasses. In: Al-Amoodi LK, Moser LE, Burson BL, Sollenberger LE (eds.) Warm-Season (C4) Grasses, Agronomy Monograph no. 45. American Society of Agronomy, Madison, pp. 745-783
- Morrone O, Zuloaga FO (1991) Revisión del género *Streptostachys* (Poaceae-Panicoideae), su posición sistemática dentro de la tribu Paniceae. Annals of the Missouri Botanical Garden 78:359-376
- Morrone O, Zuloaga FO (1992) Revisión de las Especies Sudamericanas Nativas e Introducidas de los Géneros *Brachiaria* y *Urochloa* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). Darwiniana 31:43-109
- Morrone O, Zuloaga FO (1993) Sinopsis del género *Urochloa* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae) para Mexico y América Central. Darwiniana 32:59-75
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction. Methods in Enzymology 155:335-350
- Ndikumana J (1985) Etude de l'hybridation entre espèce apomictiques et sexuées dans le genre *Brachiaria*. Tese de Doutorado. Université Catholique de Louvain.
- Nelson SCH, Fernández CFJ (1998) De Xora hondurensi notulae, praecipue nomenclaturales. Fontqueria 51:3-4
- Nguyen TQ (1966) Novit Syst Plan Vascul. Acad. Nauka URSS 12-14.
- Nogler GA (1984) Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus-Auricomus*. 5. Conclusion. Botanica Helvetica 94(2):411-422
- Olufowote JO, Xu YB, Chen XL, Park WD, Beachell HM, Dilday RH, Goto M, McCouch SR (1997) Comparative evaluation of within-cultivar variation of rice (*Oryza sativa* L) using microsatellite and RFLP markers. Genome 40(3):370-378
- Osborn TC, Pires JC, Birchler JA, Auger DL, Chen ZJ, Lee HS, Comai L, Madlung A, Doerge RW, Colot V, Martienssen RA (2003) Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. Trends in Genetics 19(3):141-147

- Pagliarini MS, Risso-Pascotto C, de Souza-Kaneshima AM, Valle CB do (2008) Analysis of meiotic behavior in selecting potential genitors among diploid and artificially induced tetraploid accessions of *Brachiaria ruziziensis* (Poaceae). *Euphytica* 164(1): 181-187
- Parsons JJ (1972) Spread of African grasses to the American tropics. *Journal of Range Management* 25(1):12-17
- Penteado MI de O, Hernandez M, Savidan YH, Santos AS, Valle CB do (1996) Variation in DNA content in *Brachiaria* spp.. *Revista Brasileira de Genética* 19:291-291
- Penteado MI de O, Santos ACM dos, Rodrigues IF, Valle CB do, Seixas MAC, Esteves A (2000) Determinação de ploidia e avaliação da quantidade de DNA total em diferentes espécies do gênero *Brachiaria*. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* no. 11. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande
- Pessino SC, Ortiz JPA, Leblanc O, Valle CB do, Evans C, Hayward MD (1997) Identification of a maize linkage group related to apomixis in *Brachiaria*. *Theoretical and Applied Genetics* 94:439-444
- Pessino SC, Evans C, Ortiz JPA, Armstead I, Valle CB do, Hayward MD (1998) A genetic map of the apospory-region in *Brachiaria* hybrids: identification of two markers closely associated with the trait. *Hereditas* 128(2):153-158
- Peters M, Franco LH, Schimidt A, Hincapie B (2003) *Especies Forrajeras Multipropósito: Opciones para Productores de Centroamérica*. CIAT Publication No. 333. CIAT, Cali.
- Pinheiro AA, Pozzobon MT, Valle CB do, Penteado MIO, Carneiro VT (2000) Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants using colchicine. *Plant Cell Reports* 19:274-278
- Ramsey J, Schemske DW (2002) Neopolyploidy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33:589-639
- Renvoize SA, Clayton WD, Kabuye CHS (1996) Morphology, taxonomy, and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb.. In: Miles JW, Maass BL, Valle CB do (eds.) *Brachiaria: biology, agronomy and improvement*. Embrapa/CIAT, Cali, pp 1-15
- Rieseberg LH, Willis JH (2007) Plant speciation. *Science* 317(5840):910-914
- Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Valle CB do, Mendes-Bonato AB (2003a) Chromosome number and microsporogenesis in a pentaploid accession of *Brachiaria brizantha* (Gramineae). *Plant Breeding* 122(2): 136-140
- Risso-Pascotto C, Mendes-Bonato AB, Pagliarini MS, Valle CB do (2003b) Comportamento citológico durante a microsporogênese em *Brachiaria ruziziensis* e *Brachiaria decumbens*. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* no. 16. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande

- Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Valle CB do (2003c) A mutation in the spindle checkpoint arresting meiosis II in *Brachiaria ruziziensis*. *Genome* 46(4): 724-728
- Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Valle CB do, Jank L (2004a) Asynchronous meiosis in an interspecific hybrid of *Brachiaria ruziziensis* and *B. brizantha*. *Plant Cell Reports* 23(5): 304-310
- Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Valle CB do, Jank L (2004b) Asynchronous meiotic rhythm as the cause of selective chromosome elimination in an interspecific *Brachiaria* hybrid. *Plant Cell Reports* 22(12): 945-950
- Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Valle CB do, Jank L (2005a) Symmetric pollen mitosis I and suppression of pollen mitosis II prevent pollen development in *Brachiaria jubata* (Gramineae). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38(11): 1603-1608
- Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Valle CB do (2005b) Multiple spindles and cellularization during microsporogenesis in an artificially induced tetraploid accession of *Brachiaria ruziziensis* (Gramineae). *Plant Cell Reports* 23(8): 522-527
- Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Valle CB do (2005c) Meiotic behavior in interspecific hybrids between *Brachiaria ruziziensis* and *Brachiaria brizantha* (Poaceae). *Euphytica* 145(1-2): 155-159
- Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Valle CB do (2006a) A new basic chromosome number for the genus *Brachiaria* (Trin.) Griseb.. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). *Genetic Resources and Crop Evolution* 53(1): 7-10
- Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Valle CB do (2006b) Microsporogenesis in *Brachiaria dictyoneura* (Fig. & De Not.) Stapf (Poaceae: Paniceae). *Genetics and Molecular Research* 5(4): 837-845
- Risso-Pascotto C, Mendes DV, Silva N, Pagliarini MS, Valle CB do (2006c) Evidence of allopolyploidy in *Brachiaria brizantha* (Poaceae: Paniceae) through chromosome arrangement at metaphase plate during microsporogenesis. *Genetics and Molecular Research* 5(4): 797-803
- Rodriguez DJ (1996) A Model for the Establishment of Polyploidy in Plants. *The American Naturalist* 147:33-46
- Savidan YH (2000) Apomixis: genetics and breeding. *Plant Breeding Reviews* 18:13-86
- Seiffert NF (1984) Gramíneas Forrageiras do Gênero *Brachiaria*. Circular Técnica no. 1. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande
- Sendulsky T (1977) Chave para identificação de *Brachiaria*. *Jornal Agroceres* 5(56):4-5

- Serrão EAD (1977) Adaptação de gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria* na Amazônia. In: Empresa Goiana De Pesquisa Agropecuária, Goiânia, GO. Encontro sobre forrageiras do gênero *Brachiaria*. p.31
- Serrão EAS, Simão Neto MS (1971) Informações sobre duas espécies de gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria* na Amazônia: *B. decumbens* Stapf e *B. ruziziensis* Germain et Evrard. Série Estudos sobre forrageiras na Amazônia 2(1). Instituto de Pesquisa e Experimentação Agropecuária do Norte, Belém
- Sharp D, Simon BK (2002) AusGrass (CD ROM): Grasses of Australia.
- Simioni C, Valle CB do (2006) Indução de poliploidia em *Brachiaria decumbens* através de cultura de tecidos. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia 43 João Pessoa Anais UFPB CD-Room
- Soltis PS, Soltis DE (2000) The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 97:7051–7057
- Soltis DE, Soltis PS, Tate JA (2004) Advances in the study of polyploidy since plant speciation. New Phytologist 161:173–191
- Stapf O (1920) Gramineae (Maydeae-Paniceae). In: Prain D (ed.) Flora of tropical Africa, 9. L. Reeve, Kent, England, pp. 422–606
- Staples IB (1971) Plant collection in Africa and Madagascar. Plant Introduction Review 8:9-16
- Stebbins G.L. (1971) Chromosomal Evolution in Higher Plants. Edward Arnold, London
- Strickland RW (1972) Plant collection mission to Africa, 1971-72. Plant Introduction Review 9:17-21
- Swenne A, Louant B-P, Dujardin M (1981) Induction par la colchicine de formes autotétraploides chez *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard (Graminée). Agronomie Tropicale 36:134-141
- Tautz D, Renz M (1984) Simple Sequence repeats are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucleic Acids Research 12:4127-4138
- Thompson RA, Estes JR (1986) Anthecial and foliar micromorphology and foliar anatomy of *Brachiaria* (Poaceae: Paniceae). American Journal of Botany 73:398–408
- Torres Jr AM, Rosa FRT, Nogueira MP (2004) Mais boi em menos pasto. Revista de Agronegócios da FGV agosto de 2004.
- Trinius CB (1834) Panicearum genera retractavit speciebusque compluribus illustravit. The copy in the smithsonian libraries, dated June 1834 in pencil, is paginated from 1 through 267, and the title page indicates neither city nor publisher. It is a preprint of the paper with the same title in the following: 1835, Memoires de l'Academie Imperiale des Sciences de Saint-Petersbourg, sixth series (Sciences Naturelles), 1: 89-355

- Torggler MGF, Contel EPB, Torggler SP. (1995) Isoenzimas - Variabilidade genética em plantas. Série Monografias no. 1. Sociedade Brasileira de Genética
- US Department of Agriculture (1974) Plant inventory no. 179 (PI 355921-368260). USDA, Washington DC
- US Department of Agriculture (1978) Plant inventory no. 179 (PI 405410-414155). USDA, Washington DC
- Utsunomiya KS, Pagliarini MS, Valle CB do (2005) Microsporogenesis in tetraploid accessions of *Brachiaria nigropedata* (Ficalho & Hiern) Stapf (Gramineae). Biocell 29(3): 295-301
- Valle CB do, Milles JW (1994) Melhoramento de gramíneas do gênero *Brachiaria*. In: Peixoto AM, Moura JC de, Faria VP de (eds.) Anais do XI simpósio sobre manejo da pastagem. FEALQ, Piracicaba, pp 1-23
- Valle CB do, Savidan YH (1996) Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*. In: Miles JW, Maass BL, Valle CB do (eds.) *Brachiaria*: biology, agronomy and improvement. Embrapa/CIAT, Cali, pp 147-163
- Valle CB do, Simioni C, Resende RMS, Jank L (2008) Melhoramento genético de *Brachiaria*. In: Resende RMS, Valle CB do, Jank L (eds.) Melhoramento de Forrageiras Tropicais. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, pp 13-54
- Valle CB do, Pagliarini MS (2009) Biology, cytogenetics and breeding of *Brachiaria*. In: Singh RJ (ed.) Genetic resources, chromosome engineering and crop improvement: Forage crops. CRC Press, Boca Raton, 103-151
- Varshney RK, Thomas T, Stein N, Langridge P, Graner A (2002) *In silico* analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species. Cellular and Molecular Biology Letters 7:537-546
- Veldkamp JF (1996a) *Brachiaria*, *Urochloa* (Gramineae-Paniceae) in Malaysia. Blumea 41:413-437
- Veldkamp JF (1996b) Proposal to conserve the name *Brachiaria* (Trin.) Griseb. (Gramineae) with a conserved type. Taxon 45:319-320
- Veldkamp JF (2004) Miscellaneous notes on mainly Southeast Asian Gramineae. Reinwardtia 12:135-140
- Vieira JM (1974) Espaçamento e densidade de semeadura de *Brachiaria decumbens* Stapf para formação de pastagens. Tese de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.
- Vieira DM, Bonato ABM, Pagliarini MS, Valle CB do (2005) Abnormal meiotic behavior in *Brachiaria brizantha* (Poaceae) leading to microspore degeneration. Caryologia 58(4): 396-402

- Vilela H (2005) Pastagem - Seleção de plantas forrageiras - Implantação e adubação. Aprenda Fácil Editora, Viçosa
- Webster RD (1987) The Australian Paniceae (Poaceae). J. Cramer, Berlin and Stuttgart,
- Webster RD (1988) Genera of the North American Paniceae (Poaceae: Panicoideae). Systematic Botany 13:576-609
- Wendel JF (2000) Genome evolution in polyploids. Plant Molecular Biology 42:225-249
- Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research 18:7213-7218
- White GM, Boshier DH, Powell W (1999) Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. Molecular Ecology 8(11):1899-1909
- Williams JGK, Kubelik A, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18:6531-6535
- Wu KS, Tanksley SD (1993) Abundance, polymorphism and genetic-mapping of microsatellites in rice. Molecular and General Genetics 241(1-2):225-235
- Wunderlin RP, Hansen BF (2001) Seven new combinations in the Florida flora. Novon 11:366-369
- Yang GP, Maroof MAS, Xu CG, Zhang QF, Biyashev RM (1994) Comparative-analysis of microsatellite DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice. Molecular and General Genetics 245(2):187-194
- Zuloaga FO, Morrone O (2003) *Brachiaria*, *Urochloa*. In: Zuloaga FO, Morrone O, Davidse G, Filgueiras TS, Peterson PM, Soreng RJ, Judziewicz EJ (eds.) Catalogue of New World Grasses (Poaceae): III. Subfamilies Panicoideae, Aristidoideae, Arundinoideae, and Danthonioidae. Contributions from the United States National Herbarium 46:1-662